

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie



**Vazebná místa pro ionty vápníku vně
RTX domény
u FrpC proteinu *Neisseria
meningitidis***

Petra Lišková

Diplomová práce

Praha 2009

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Ivo Konopásek, CSc.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením vedoucího diplomové práce.

.....
Petra Lišková

Ráda bych zde poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Ivovi Konopáskovi, CSc., za neskonale trpělivou komunikaci při vedení mé práce a vždy podnětné a čerstvé nápady.

Děkuji Ing. Peteru Šebovi, CSc., za možnost pracovat v jeho laboratoři (Laboratoř molekulární biologie bakteriálních patogenů, MBÚ, AV ČR).

Mé díky patří RNDr. Radovanovi Fišerovi, v naší laboratoři figuruje jako guru na poli spektroskopickém, mikroskopickém i výpočetním, za stále nadšený a didaktický přístup.

Děkuji Ing. Radimovi Osičkovi, Ph.D., za cenné zkušenosti s FrpC proteinem a originální myšlenky, RNDr. Jiřímu Mašínovi, Ph.D., za pomoc s fluorescenčním značením proteinu a také za pomoc s tkáňovými kulturami a RNDr. Ireně Linhartové, CSc., za předané zkušenosti a podnětné nápady.

Dále bych chtěla poděkovat celému osazenstvu obou laboratoří (Laboratoř fyziologie bakterií, PŘF UK a Laboratoř molekulární biologie bakteriálních patogenů, MBÚ, AV ČR), v nichž vznikala tato práce, za nekončící pomoc při všelikém bloudění a za dobrá slova.

Také bych chtěla poděkovat svým blízkým, své mamince, babičce a příteli Pavlovi, kteří mě po dobu studia po všech stránkách podporovali.

Tato diplomová práce vznikala v letech 2007 až 2009 v rámci grantového projektu:
Výzkumný záměr MSM0021620858: Signalizace a molekulární mechanizmy buněčné
odpovědi (2007-2013).

Calcium binding sites of bacterial RTX toxins outside RTX domain

Abstract:

RTX toxins (Repeat in ToXin) are proteins bearing so called RTX domain characterized by nonapeptide glycine-rich repetitions. They are produced by Gram negative bacteria often representing their virulence factors. FrpC, representative of RTX group, which is studied in this work, is produced by *Neisseria meningitidis* during meningitis, the invasive form of meningococcal infection often leading to death. Although FrpC protein is highly immunogenic, its importance for disease etiology and pathogenesis is still unknown. The biological activity of FrpC protein consists in autocatalytic cleavage of the peptide bond between residues Asp⁴¹⁴ and Pro⁴¹⁵ outside its RTX domain and is followed by formation of isopeptide bond between Asp⁴¹⁴ and ϵ -amino group of Lys. These activities depend strongly on presence of calcium ions.

The aim of this work was to describe one of several calcium binding sites in FrpC protein outside RTX domain. For this purpose FrpC without RTX domain (FrpC Δ RTX) and its mutant form FrpC Δ RTX-D521K were used with point substitution in possible calcium binding site which disabled FrpC cleaving activity. The area around position 521 of FrpC shares sequence homology with EF-hand, eucaryotic calcium-binding protein motives. Terbium, calcium ion luminiscent analogue, was used to characterize calcium binding site(s) in FrpC Δ RTX protein. Fluorescence anisotropy measurements with intrinsic Trp and ANS-bound FrpC were used to observe conformational changes of FrpC Δ RTX protein induced by calcium. Molecular 3D structure modelling with Rosetta software was used to see the effect of D521K mutation on the putative calcium binding site. Finally, confocal studies of interaction of FrpC with J774 mouse macrophages showed the possible endocytic pathway of FrpC.

Keywords: RTX protein, FrpC protein, *Neisseria meningitidis*, calcium binding sites, calcium, terbium, autocatalytical protein cleavage, EF-hand motif, protein structure prediction

Klíčová slova: RTX protein, FrpC protein, *Neisseria meningitidis*, vazebná místa pro vápník, vápník, terbium, autokatalytické štěpení proteinů, EF-hand motif, molekulární modelování proteinů

3.2.5.4	Elektroforesa DNA fragmentů v agarosovém gelu	38
3.2.5.5	Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu pomocí Lego kitu	39
3.2.6	<i>Produkce proteinu ve 2 ml kulturách</i>	39
3.2.7	<i>Produkce proteinu v 500 ml třepané kultuře</i>	40
3.2.8	<i>Příprava cytosolického extraktu</i>	40
3.2.9	<i>Purifikace proteinů afinitní chromatografií na chitinu pomocí systému založeném na inteinu</i>	41
3.2.10	<i>Převedení proteinu do požadovaného pufru gelovou permeační chromatografií na Sephadexu G-25</i>	41
3.2.11	<i>Převedení proteinu do požadovaného pufru dialysou</i>	42
3.2.12	<i>Precipitace proteinu síranem amonným</i>	42
3.2.13	<i>Stanovení koncentrace proteinu</i>	42
3.2.13.1	Stanovení koncentrace proteinů s použitím sady BCA Protein Assay Reagent (Pierce)	42
3.2.13.2	Stanovení koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové	43
3.2.14	<i>Elektroforesa v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)</i>	43
3.2.15	<i>Stanovení enzymatické aktivity FrpC proteinu</i>	44
3.2.16	<i>Značení FrpC proteinu fluorescenční sondou Dyomics DY-647</i>	44
3.2.17	<i>Stanovení vazebných míst pro ionty terbia – titrace FrpCΔRTX proteinů roztokem chloridu terbitého – TbCl₃</i>	44
3.2.17.1	Terbium	44
3.2.17.2	Titrace proteinu roztokem chloridu terbitého a měření emisních a excitačních spekter terbia	46
3.2.17.2.1	Vyhodnocování titračních křivek Hillovou funkcí	46
3.2.17.3	Vytěsnění iontů terbia z proteinů vápenatými ionty – titrace komplexu protein-terbium roztokem chloridu vápenatého	48
3.2.17.3.1	Vyhodnocení odstranění iontů terbia z proteinů ionty – modifikované Stern-Volmerovo vynesení	48
3.2.18	<i>Měření anizotropie fluorescence tryptofanu FrpCΔRTX proteinu</i>	49
3.2.19	<i>Perrinovo vynesení</i>	50
3.2.20	<i>Mikroskopické pozorování buněk</i>	52
3.2.20.1	Příprava buněk	52
3.2.20.2	Příprava preparátu pro mikroskopii	52
3.2.20.3	Inkubace buněk s FrpC proteinem a markery endocytických drah	52
3.2.20.4	Sledování kolokalizace fluorescenčně značeného FrpC proteinu se značenými markery endocytických drah	53
3.2.21	<i>Ab Initio predikce struktury proteinů (3D modelování) pomocí programu Rosetta++ 2.3.0</i>	53
4	VÝSLEDKY	59
4.1	Produkce a purifikace rekombinantního FrpC proteinu a jeho derivátů	59
4.2	Stanovení enzymatické aktivity FrpC Δ RTX proteinu	61

4.3	Stanovení vazebných míst pro ionty terbia – titrace FrpC Δ RTX a FrpC Δ RTX-D521K proteinů roztokem chloridu terbitého	62
4.3.1	<i>Kontaminace při izolaci proteinu znemožňující správnou charakterisaci vazebných parametrů FrpCΔRTX proteinů</i>	63
4.3.2	<i>Odstranění zákalu vzniklého při vyšších koncentracích terbia (od koncentrace 100 μM Tb³⁺)</i>	67
4.3.3	<i>Zpracování dat z titrace FrpCΔRTX proteinů terbiem</i>	67
4.4	Titrace komplexů FrpC Δ RTX-Tb ³⁺ a FrpC Δ RTX-D521K-Tb ³⁺ vápníkem	69
4.4.1	<i>Modifikované Stern-Volmerovo vynesení</i>	70
4.5	Měření anizotropie fluorescence tryptofanu FrpC Δ RTX proteinu	73
4.6	Perrinovo vynesení	75
4.7	Ab Initio predikce struktury proteinů (3D modelování) pomocí programu Rosetta++ 2.3.0	78
4.8	Mikroskopické pozorování interakce FrpC proteinu s myšími makrofágy J774.A1	82
4.8.1	<i>Hodnocení kolokalizace FrpC proteinu s BSA</i>	85
4.8.2	<i>Hodnocení kolokalizace FrpC proteinu s transferrinem</i>	88
4.8.3	<i>Hodnocení kolokalizace FrpC proteinu s LysoTracker Red DND-99</i>	90
5	DISKUSE	93
6	SOUHRN	100
7	SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	101

SEZNAM ZKRATEK

a. u.	bezrozměrná jednotka (arbitrary unit, značí intenzitu fluorescence)
ATP	adenosin 5'-trifosfát
BSA	hovězí sérový albumin
CIP	telecí střevní fosfatasa (calf intestinal phosphatase)
CyaA	adenylát cyklosový toxin
λ -DNA	DNA bakteriofága lambda
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FITC	fluorescein-5-isothiokyanát
FRET	rezonanční energetický přenos (Förster resonance energy transfer)
FrpC	železem regulovaný protein C (ferric regulated protein)
IPTG	isopropyl - β -D-thiogalaktopyranosid
kDa	kilodalton
LB	kultivační médium Luria - Bertani
NEB	New England BioLabs
OD	optická densita
RPMI	RPMI medium (Roswell Park Memorial Institute)
RTX	opakované sekvence v toxinu (<u>r</u> epeats in <u>t</u> oxin)
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS - PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
v/v	poměr objemů dvou látek v roztoku
w/v	koncentrace látky v rozpouštědle (kg/l)
w/w	poměr hmotností látek v roztoku nebo suspenzi

1 Úvod

RTX proteiny jsou bakteriální produkty často činné v procesu pathogenese, kde plní funkci exotoxinu. Příslušnost proteinu do této proteinové rodiny zajišťuje RTX doména umístěná na C-konci proteinu. FrpC protein náležící mezi RTX proteiny je produktem bakterie *Neisseria meningitidis*, která je jedním z nejčastějších původců zánětů mozkových plen. Etiologie vzniku hnisavé neisseriové meningitidy není zcela objasněná. FrpC protein je často produkován invazivními klinickými izoláty této bakterie a ačkoliv by na základě příslušnosti k RTX proteinům mohl theoreticky fungovat jako exotoxin, jeho funkce je stále neznámá. Objevena však byla jeho neobvyklá enzymatická aktivita, jejíž příčina zůstává také stále neznámá - autokatalytické štěpení FrpC proteinu, které je závislé na přítomnosti vápenatých iontů.

Cílem této práce bylo sledování vlivu vápenatých iontů na konformaci FrpC proteinu bez RTX domény. Pro tento účel byla použita deleční varianta FrpC proteinu bez RTX domény (FrpC Δ RTX) a její mutovaná varianta (FrpC Δ RTX-D521K) s bodovou substituční mutací v aminokyselinovém zbytku hrajícím klíčovou roli pro vazbu vápníku v jednom z předpověděných míst vázajících vápenaté ionty mimo RTX doménu FrpC proteinu, které má vliv na jeho autokatalytické štěpení (OSICKA *et al.*, 2004). Schopnost FrpC Δ RTX proteinů vázat kovové ionty byla prověřována fluorescenčními metodami s využitím terbia, které je vazebným luminiscenčním analogem vápníku a mohlo proto být využito jako fluorescenční sonda. Dalším cílem bylo popsat konformaci variant FrpC Δ RTX v přítomnosti a nepřítomnosti vápenatých iontů. Za tímto účelem bylo použito měření anizotropie fluorescence, díky níž byla sledována rotace molekuly FrpC proteinu v daných prostředích.

Součástí této práce je také kapitola popisující molekulární 3D modelování vazebného místa pro vazbu vápenatých iontů s použitím software Rosetta. Byla modelována vazebná místa vápníku v okolí pozice 521, kde byla ve FrpC Δ RTX proteinu vnesena mutace (FrpC Δ RTX-D521K). Srovnání nalezených 3D struktur proteinů FrpC Δ RTX a FrpC Δ RTX-D521K mělo objasnit různou schopnost vazby vápenatých iontů těmito variantami proteinu. Předpokládali jsme, že snížení autokatalytické aktivity v důsledku substituční

mutace D521K má původ v rozdílné konformaci proteinu a v jejím důsledku v nižší vazbě vápníku.

Závěrečnou kapitolu této práce tvoří konfokální studie interakce fluorescenčně značeného FrpC proteinu s buňkami myší makrofágové linie J774.A1. Bylo testováno, zda FrpC protein je transportován do buňky podobně jako jiné RTX proteiny a sledován typ transportu FrpC do buňky.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 RTX proteiny

RTX (Repeat in ToXin) rodina proteinů je skupina proteinů produkovaných gramnegativními bakteriemi, často pathogenními. Příslušnost k této proteinové rodině je dána přítomností tzv. RTX domény v C-koncové části proteinu, pro kterou je typická přítomnost nonapeptidových repetitivních sekvencí bohatých na glycin, které mají konservovaný konsensus motivu: L/I/F-X-G-G-X-G-N/D-D-X (kde X je jakýkoliv aminokyselinový zbytek). Velká část těchto proteinů patří mezi virulenční faktory bakterií, které je produkují, exotoxiny. Na základě své aktivity jsou RTX proteiny rozděleny do skupin: cytolytické (hemolysiny a leukotoxiny), metalloproteasy, lipasy (tyto tři skupiny tvoří podskupinu RTX proteinů zvanou RTX toxiny), bakteriociny, a proteiny s neznámou funkcí (LALLY *et al.*, 1999), proteiny S-vrstvy a proteiny spojené s nodulací (OMORI a IDEI 2003).

Gen pro RTX protein je součástí operonu, spolu s geny pro exportní systém zjišťující produkci a sekreci RTX proteinu, kde jsou geny typicky řazeny *rtxCABD*. Tento exportní systém typu I je zajišťován ABC exportním systémem (OMORI a IDEI 2003). RtxA protein je zpravidla zmiňovaným RTX proteinem. RtxC protein zajišťuje posttranslační modifikaci RtxA proteinu acylací, kterou je RtxA protein aktivován a která proteinu zajišťuje účinnější vazbu do membrány (LUDWIG *et al.*, 1996). Proteiny RtxB a RtxD jsou součástí TOSS (sekreční systém typu jedna, type one secretion systém), RtxB je ATP vazebný protein a RtxD je protein fúze membrán (LALLY *et al.*, 1999). Další protein spojený s produkcí RTX proteinu je protein vnější membrány RtxE, který je uložen v jiné části chromozomu. Všechny tyto proteiny jsou produkovány současně. Sekreci RtxA proteinu zajišťuje C-koncový sekreční signál (SOLOAGA *et al.*, 1996).

RTX doména váže vápenaté ionty (BAUMANN *et al.*, 1993; ROSE *et al.*, 1995), na čemž je závislá její struktura a funkčnost. Vápenaté ionty jsou vázány do struktury uvnitř repetitivních sekvencí s motivem G-G-X-G-X-D. Afinita vápenatých iontů k těmto strukturám je proměnná a závisí na tom, jak moc se konkrétní sekvence liší od konsensu vazebné sekvence. Navázáním vápenatých iontů do RTX domény nabývá RTX doména kompaktnější

konformace tvorbou sekundárních struktur β -helixu (β -sheet helixy, β -roll) (RHODES *et al.*, 2001). Počet míst vázajících vápenaté ionty uvnitř RTX domény je variabilní a v RTX proteinech se liší, např. RTX doména adenylát cyklasového toxin bakterie *Bordetella pertussis* obsahuje 37 repetice (RHODES *et al.*, 2001), alkalycká proteasa *Pseudomonas aeruginosa* 6 repetice (BAUCHE *et al.*, 2006) a hemolysin *Escherichia coli* 11-17 repetice (SANCHEZ-MAGRANER *et al.*, 2007) tvořících pravidelné β -listy skládané do helixu.

2.1.1 RTX toxiny

RTX toxiny se dělí do dvou kategorií podle specifity, kterou zaujmají ke svým cílovým buňkám: První kategorii tvoří hemolysiny, např. α -hemolysin *E. coli* (HlyA), který je toxický pro širokou škálu buněk. Toxiny druhé kategorie, leukotoxiny, mají úzkou specifitu k cílovým buňkám, např. leukotoxin LktA *Pasteurella haemolytica*, k bovinním mízním buňkám (bovine lymphoid cells). Interakce RTX toxinů s buňkami má dvě fáze: v první fázi toxin pasivně adhezuje na povrch všech dostupných buněk, tato fáze je vratná a je závislá na elektrostatických silách. V druhé fázi dochází k včlenění toxinu do membrány hostitelské buňky a dochází ke konformační změně toxinu, po které již toxin nemůže od buňky difundovat. Důležitým faktorem, který ovlivňuje vazbu toxinu do membrány, je kotranslační modifikace některých lysinů RTX toxinů acylací. Specifita, se kterou RTX toxiny adhezuji k cílovým buňkám, je dána vazbou na povrchové receptory buňky doménou RTX toxinu, která je určena k rozpoznání receptoru. Příkladem může být rozpoznání β 2 integrinového receptoru (CD11b/CD18) adenylát cyklasovým proteinem (CyaA) *Bordetella pertussis* (LALLY *et al.*, 1997). Navázání RTX toxinů do membrány cílové buňky působí na tuto buňku letálně, dochází zde k apoptose nebo nekrose. Způsob smrti buňky závisí na dozi RTX toxinu, který buňku opůsobil, a závisí také na mitochondriálních dysfunkcích dané buňky. Buněčná smrt indukovaná RTX toxiny je také funkcí schopnosti toxinu zformovat v membráně napadené buňky kanál (např. kation selektivní kanál tvořený adenylát cyklasovým proteinem (CyaA) *Bordetella pertussis* (BENZ *et al.*, 1994), což je samozřejmě závislé také na jeho koncentraci. Převzato z (LALLY *et al.*, 1999).

2.2 *Neisseria meningitidis*

Neisseria meningitidis je gramnegativní aerobní diplokok. Je obligátním parazitickým organismem, jehož jediným hostitelem je člověk. Při infekci nastává zpravidla jeden ze třech dobře popsaných stavů: bezpříznakové nosičství, faryngitida nebo meningitida. První zmínka o této bakterii pochází z roku 1805. Lékař Gaspard Vieusseux popsal epidemii, která se objevila toho roku v Ženevě („Memory on the disease which reigned in Geneva in spring of 1805“). Ačkoliv etiologie této nemoci nebyla ještě odhalena, Vieusseux správně odvodil charakter choroby jako „nepřenosnou zhoubnou mozkovou horečku“ („non-contagious malignant cerebral fever“). Roku 1887 byl již „*Diplococcus meningitidis*“, dřívější označení *Neisseria meningitidis*, popsán jako původce cerebrospinální meningitidy. Až roku 1896 byl popsán stav bezpříznakového nosičství F. Kieferem (cit. podle DE SOUZA a SEGURO 2008).

Neisseria meningitidis přežívá v horních cestách dýchacích ve stavu bezpříznakového nosičství, které je rozšířeno asi v 10 % populace. Je podmíněno mnoha faktory hostitele, jako jsou stres a pobyt v kolektivech, socioekonomické faktory, etnický původ a užívání tabákových výrobků, zdravotní faktory – např. jiné infekce respiračního traktu (YAZDANKHAH a CAUGANT 2004). Nosičství je dočasné a většinou je ukončeno spontánně bez terapeutického zásahu. V některých případech může *Neisseria meningitidis* způsobit faryngitidu. Stav „soužití“ pathogena s hostitelem jsou dány vyvážeností vztahu pathogena s imunitní odpovědí hostitele. Je-li tato rovnováha porušena, patogen je eliminován, nebo kolonizuje hostitele ve větší míře a propuká nemoc. Tehdy se ze stavu bezpříznakového nosičství vyvíjí meningitida, zánět mozkových plen. Rozvoj meningitidy bývá rapidní, příznaky v raném stadiu jsou spíše nespecifické: horečka, bolest hlavy, ztráta vědomí a petechiální lese v pozdějším rozvoji onemocnění (DEVOE 1982; BEDNÁŘ *et al.*, 1996). Bez včasného rozpoznání a nasazení terapie spočívající v podání antibiotik (penicilin) meningitida často končí smrtí hostitele. Důvod, proč bakterie náhle opustí svůj „saprofytický nebo komensální“ způsob života a vyvine se do invazivní formy, není zcela znám. *Neisseria meningitidis* adhezuje na epithel faryngu (receptor CD46) a prochází buňkami epithelu (buď transcytosou na basolaterální povrch s použitím přestavby aktinu buňky nebo

prochází pevnými spojeními mezi buňkami (tight-junctions). Poté invaduje do krevního řečiště a krví putuje do mozkomíšního moku, penetruje do centrálního nervového systému, kde se dále pomnožuje (TZENG a STEPHENS 2000). Pomnožením bakterie v krevním řečišti může nastat sepse. Buněčné a molekulární mechanismy neisseriové meningitidy a sepse nejsou dosud zcela vysvětleny. Přesto jsou známy faktory, které hrají roli ve vyváženosti vztahu hostitel-pathogen.

Faktory ovlivňující stav kolonizace a invaze jsou trojího typu: faktory hostitele, prostředí a pathogena. K faktorům hostitele ovlivňujícím stav meningokové nákazy patří výše zmíněná infekce dýchacího traktu, dále věk (nejvyšší riziko nákazy je u malých dětí a u adolescentních jedinců a mladých dospělých), dále pak přítomnost sekrečních AB0 antigenů, absence protilátek (IgA) v seru (TZENG a STEPHENS 2000), jakož i schopnost aktivace komplementu (VOGEL a FROSCH 1999). K faktorům prostředí patří kouření, sezónní faktory (např. Brazílie v období dešťů), stres (pouť do Mekky, vojenské výcvikové tábory). Faktory *Neisseria meningitidis* ovlivňující kolonizaci a invazivitu jsou virulenční faktory, jejichž kvalita a kvantita výrazně ovlivňuje rovnováhu mezi schopností bakterie uniknout imunitní odpovědi hostitele a její přežití. Patří k nim bakteriální pouzdro, pili, endotoxin (LOS, lipooligosacharid), IgA1 proteasa, variabilita povrchových struktur, molekulární mimikry, získávání železa a přítomnost fága.

Pouzdro *Neisseria meningitidis* má obecné vlastnosti bakteriálních pouzder, je antifagocytické, antibaktericidní (READ *et al.*, 1996) a dovoluje bakterii přežít v intracelulárních kompartmentech imunitních buněk. Pouze kmeny *Neisseria meningitidis* tvořící pouzdro sou schopny způsobit invazivní meningitidu. Je tvořeno polysacharidy a podle rozdílů ve složení polysacharidů je *Neisseria meningitidis* rozdělena do 13 seroskupin (A, B, C, D, H, I, K, L, X, Y, Z, 29E, W135), z nichž 9 způsobuje invazivní formu onemocnění (značeny A, B, C, D, X, Y, Z, 29E, W135). Nejčastěji se na invazivních formách onemocnění podílejí seroskupiny A, B, C, Y a W135. Na pouzderných polysacharidech je založena vakcína pro prevenci meningokokových onemocnění (FRASCH 1989). K dispozici je vakcína proti seroskupinám A, C, Y a W135. Pouzderný polysacharid seroskupiny B jen málo imunogenní,

protože je tvořen z polysialové kyseliny spojené alfa 2-6 vazbou a vzniklá struktura, ($\alpha 2 \rightarrow 8$) polysialová kyselina, je povrchově identická s molekulou adhesinu neuronů N-CAM (FINNE *et al.*, 1987; TZENG a STEPHENS 2000). Z tohoto důvodu tedy nelze proti této seroskupině účinně chránit. Obsah polysialové kyseliny v pouzdru skupiny B navíc hraje roli v aktivaci komplementu alternativní cestou – čím méně sialové kyseliny je asociováno s pouzdrem, tím je schopnost C3 částice komplementu adherovat na povrch pouzdra vyšší (JARVIS a VEDROS 1987). Dalším faktorem virulence je přítomnost pili. Pili typu IV jsou nezbytné pro adhezi *Neisseria meningitidis* na povrch nosohltanu v počátečních fázích infekce (NASSIF *et al.*, 1994). Všechny klinické izoláty produkují tyto pili (DEVOE a GILCHRIST 1978), laboratorní pasáží těchto klinických izolátů bakterie pili po čase ztratí. Pili navíc zajišťují genetickou kompetenci, neisserie jsou pak schopné přijímat genetickou informaci horizontálním přenosem DNA, transformace je přitom nečastější formou horizontálního přenosu (např. přenos *sodC* genu pro superoxid dismutasu *Haemophilus influenzae* (TZENG a STEPHENS 2000). Meningokoky na svém povrchu exponují poriny, dva hlavní poriny PorA (kationt selektivní porin) a PorB (aniont selektivní porin) jsou imunogenní. Jako spolehlivě imunogenní a vždy přítomné proteiny na povrchu meningokoků jsou poriny použity pro typizaci *Neisseria meningitidis*. Podle porinu PorB se meningokoky řadí do serotypů, podle porinu PorA do serosubtypů. Pro přesnější typizaci meningokoků byla zavedena typizace MLEE (multilocus enzyme electrophoresis) na základě polymorfismu variabilních oblastí PorA proteinu a PorB proteinu (JOLLEY *et al.*, 2007). Jiné povrchové proteiny důležité v pathogenesi jsou Opa a Opc proteiny, proteiny vnější membrány, které se podílejí na adhezi bakterií k hostitelským buňkám, jejich exprese je variabilní v čase. Hlavním faktorem virulence a dalším objektem typizace *Neisseria meningitidis* je endotoxin, lipooligosacharid (LOS), podle něhož se meningokoky dělí do imunotypů. Oproti klasickému lipopolysacharidu, jaký je popsán například u bakterie *Escherichia coli*, zde chybí O-antigen. LOS je uvolňován při dělení bakterií, při autolyse, které meningokoky často podléhají, a při uvolňování váčků tvořených vnější membránou („blebbing“) do prostředí, čímž iniciují zánětlivou reakci. Dalším faktorem virulence je IgA1 proteasa schopná štěpit hostitelské protilátky IgA. Cílem je zabránit opsonizaci bakterií

adherujících na epitelu nosohltanu. Jiným faktorem ovlivňujícím stav, ve kterém se meningokoky v hostiteli nacházejí, je přítomnost „ostrova pathogenicity“ MDA (meningococcal disease associated island), se kterým je asociován profág homologní s filamentárním fágem M13 s neznámou funkcí. Výzkum ukázal, že přítomnost profága v genomu *Neisseria meningitidis* koreluje se schopností této bakterie způsobit invazivní formu meningitidy (BILLE *et al.*, 2005). V neposlední řadě je pro existenci meningokoků v hostiteli důležitá schopnost získat železo, kofaktor důležitých metabolických procesů, které se volně v hostitelském organismu nevyskytuje. Pathogenní neisserie neprodukuje vlastní siderofory (WEST a SPARLING 1985), jsou však schopny získat železo vázané na cizí molekuly (siderofory jiných bakterií nacházejících se v nosohltanu, proteiny hostitele vázající železo transferrin a lactoferrin i železo vázané v hemu a hemoglobinu), pro které mají neisserie receptory (SCHRYVERS a STOJILJKOVIC 1999).

Limitace železem je pro prostředí hostitelského organismu typická, v tomto prostředí dochází k aktivaci genů regulovaných železem. K těmto genům často patří i virulenční faktory, např. Shiga-like toxin *E. coli* (O'BRIEN *et al.*, 1982; CLEARY *et al.*, 1985) a exotoxin *P. aeruginosa* (BJORN *et al.*, 1978). Mezi virulenčními faktory *Neisseria meningitidis* neisseriové meningitidy však není znám žádný exotoxin. U *Neisseria meningitidis* jsou však za podmínek limitace železem produkovány FrpA a FrpC proteiny (Fe-regulated protein) (GRIFANTINI *et al.*, 2003; BASLER *et al.*, 2006), které na základě sekvenční homologie přítomné RTX domény náleží do RTX proteinové rodiny (THOMPSON a SPARLING 1993; THOMPSON *et al.*, 1993; KUHNERT *et al.*, 1997).

2.2.1 FrpC protein *Neisseria meningitidis*

FrpC protein (Fe-regulated protein) je strukturním proteinem RTX operonu zahrnujícím zpravidla tento strukturní protein, protein modifikující strukturní protein a exportní systém tohoto proteinu. Je sekretován do media za podmínek limitace železem bakterií *Neisseria meningitidis* FAM20 (izolát séroskupiny C), tedy na kmeni, na kterém byl FrpC protein studován. Kromě FrpC proteinu náleží k tomuto operonu také FrpD protein, který je také

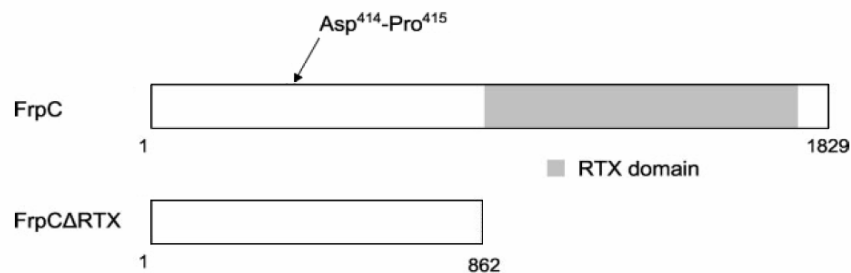
sekretován do media. FrpD je lipoprotein vnější membrány, který má afinitu k FrpC proteinu. Jeho funkce je stejně jako u FrpC proteinu neznámá a FrpD také nevykazuje sekvenční homologii s jiným dosud známým proteinem (PROCHAZKOVA *et al.*, 2005). Sekrece FrpC proteinu probíhá podobně jako u ostatních RTX proteinů sekrečním systémem typu I (tzv. ABC exporter). Genetická organizace tohoto sekrečního aparátu u *Neisseria meningitidis* je odlišná od ostatních bakterií produkujících RTX proteiny a je unikátní: geny pro ATP-vazebný protein (ATP-binding protein) a protein fúze membrán (*hlyB* a *hlyD*) nesousedí v těsné blízkosti a geny pro protein fúze membrán (*hlyD*) a protein vnější membrány (*tolC*) jsou exprimovány nezávisle na sobě, jak je tomu u ostatních exportních systémů RTX proteinů. Lokusy nesoucí geny *hlyB* a *hlyD/tolC* jsou ohraničeny inserčními sekvencemi, což naznačuje, že tyto geny mohly meningokoky získat horizontálním přenosem (WOOLDRIDGE *et al.*, 2005).

FrpC protein je vysoce imunogenní a zdá se, že může plnit nějakou úlohu v pathogenezi nesseriové meningitidy, protože během invazivní meningitidy jsou u většiny pacientů produkovány serové protilátky proti FrpC proteinu. Tyto protilátky byly produkovány mimo jiné i zdravými kontakty pacientů s nesseriovou meningitidou (OSICKA *et al.*, 2001). Výzkum však ukázal, že za použití zvířecího modelu (mladí potkani) není FrpC protein pro virulenci *Neisseria meningitidis* nezbytný (FORMAN *et al.*, 2003).

2.2.1.1 Struktura a aktivita FrpC proteinu

FrpC protein (obr. 1) obsahuje 1829 aminokyselinových zbytků, jeho relativní molekulová hmotnost je 198 kDa. C-koncová část tohoto proteinu obsahuje nonapeptidové repetice bohaté na glycin, které jsou typické pro všechny RTX proteiny a které tento protein na základě sekvenční homologie řadí do rodiny RTX proteinů (THOMPSON *et al.*, 1993). Na C-konci se také nachází signál pro sekreci tohoto proteinu. N-koncová část proteinu v rozsahu zbytků 1-862 je část proteinu neobsahující nonapeptidové repetice. Jeho oblast tvořená aminokyselinovými zbytky 400-657, tzv. samoštěpitelný modul (self-processing module, SPM) je nositelem biologické aktivity FrpC proteinu, kterou je autokatalytické štěpení „sebe sama“ za přítomnosti vápenatých iontů

a následné kovalentní propojení fragmentů vzniklých štěpením za vzniku vysokomolekulárních forem (OSICKA *et al.*, 2004).

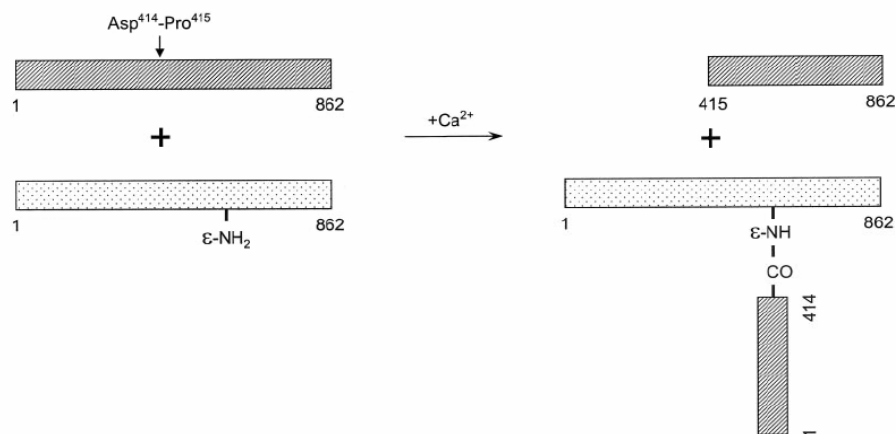


Obr. 1: Schematické znázornění FrpC a FrpC Δ RTX proteinu. Šipkou je zde znázorněno místo štěpení (Asp⁴¹⁴-Pro⁴¹⁵), bíle je znázorněna část proteinu bez nonapeptidových repetic, šedě RTX doména obsahující nonapeptidové repetice bohaté na glycin (převzato z OSICKA *et al.*, 2001).

Segmenty této části (400-657) vykazují vysokou podobnost s ApxIVA proteinem patogenní bakterie *Actinobacillus pleuropneumoniae* (OSICKA *et al.*, 2004), u kterého bylo také prokázáno, že je autokatalyticky štěpen a následně propojen do vysokomolekulárních forem (OSICKA *et al.*, 2004). Sekvence, které nesou jistý stupeň podobnosti s SPM FrpC proteinu, byly nalezeny také v genomech bakterií *Xylella fastidiosa*, *Ralstonia solanacearum* a *Rhizobium leguminosarum* (OSICKA *et al.*, 2004). Okrajové části FrpC proteinu v okolí SPM, aminokyselinové zbytky 1-400 a 658-880, nenesou žádnou sekvenční homologii s žádným známým proteinem.

Štěpení FrpC proteinu má autokatalytický mechanismus. Protein je štěpen mezi aminokyselinovými zbytky Asp⁴¹⁴ a Pro⁴¹⁵ a jeho štěpení je závislé na přítomnosti vápenatých iontů ve fyziologické koncentraci. Produkty štěpení FrpC proteinu jsou fragmenty o molekulové hmotnosti 45 kDa (N-konec) a 150 kDa (C-konec). Autokatalytické štěpení FrpC proteinu není možné inhibovat žádným z dostupných inhibitorů proteas (serinových, aspartátových, cysteinových i metaloproteas), FrpC protein ani neobsahuje žádný strukturní motiv proteas, štěpení FrpC proteinu není založeno na mechanismech štěpení proteas (OSICKA *et al.*, 2004). Dalším krokem, který následuje po autokatalytickém štěpení, je tvorba vysokomolekulárních forem FrpC proteinu, které jsou navzájem propojeny isopeptidovou vazbou zbytku Asp⁴¹⁴ na

štěpením vzniklém N-koncovém fragmentu (viz. obr. 2), který se nachází na jeho C-konci, a ϵ -aminoskupinou jiné molekuly FrpC proteinu (OSICKA *et al.*, 2001).



Obr. 2: Schema předpokládaného mechanismu enzymatické aktivity FrpC proteinu. Na obrázku je znázorněn FrpC Δ RTX protein, na němž je vyznačené místo štěpení (Asp⁴¹⁴-Pro⁴¹⁵) a ϵ -amino skupina lysinu. V přítomnosti Ca²⁺ je FrpC Δ RTX protein štěpen a následně kovalentně spojen nově vzniklým N-koncem s ϵ -amino skupinou lysinu jiné molekuly FrpC Δ RTX proteinu (převzato z OSICKA *et al.*, 2001).

SPM FrpC proteinu lze úspěšně použít pro purifikaci rekombinantních proteinů za použití afinitní chromatografie a samoštěpící aktivity SPM, která je aktivována přidáním vápenatých iontů jako jediného agens aktivujícího štěpení (SADILKOVA *et al.*, 2008).

2.2.1.1.1 Vazebná místa pro vápenaté ionty ve FrpC proteinu mimo RTX doménu

Protože FrpC protein neobsahuje strukturní motiv proteas, který by vysvětloval mechanismus autokatalytického štěpení FrpC proteinu, a protože autokatalytické štěpení tohoto proteinu je závislé na vápenatých iontech, byl v sekvenci FrpC proteinu hledán strukturní motiv „EF-hand“, který představuje strukturu vázající vápenaté ionty zejména u eukaryotních proteinů. Ve FrpC proteinu bylo mimo RTX doménu, uvnitř SPM, nalezeno pět potenciálních míst vázajících vápenaté ionty s různým stupněm homologie (similarity) s EF-hand motivem: mezi aminokyselinovými zbytky 439-451 (72 %), mezi

aminokyselinami 462-474 (74 %), mezi aminokyselinami 499-511 (91 %), mezi aminokyselinami 521-533 (89 %) a mezi aminokyselinami 585-597 (75 %) (OSICKA *et al.*, 2004). Dvě z těchto míst (499-511 a 521-533) sdílející s EF-hand motivem vysoký stupeň homologie (91 % a 89 %) mají konservované všechny aminokyseliny, které hrají klíčovou roli ve vazbě vápenatého iontu EF-hand strukturou (OSICKA *et al.*, 2004). Substitucí (bodovou mutací) důležitých aminokyselin uvnitř sekvencí homologních s EF-hand motivem nesoucích negativní náboj (D499K, D510A, D521K a E532A) a delecí Δ A510 byla redukována enzymatická aktivita FrpC proteinu. Současnou substitucí D469K a delecí Δ A511 byla enzymatická aktivita FrpC proteinu zrušena zcela. Jako aminokyselinové zbytky činné v ovlivnění autokatalytické aktivity FrpC proteinu vazbou vápenatých iontů byly nalezeny Asp⁴⁶⁷, Asp⁴⁹⁹, Asp⁵¹⁰, Asp⁵²¹ a Glu⁵³² (OSICKA *et al.*, 2004).

2.3 Proteiny vázající Ca²⁺

Vápník je jedním z životně nejdůležitějších kovů. Podílí se na životních procesech od mineralizaci kostní tkáně po buněčnou signalizaci. Vápník interaguje s velkým množstvím proteinů, z nichž proteiny obsahující EF-hand strukturu jsou nejběžnější (LEWIT-BENTLEY a RETY 2000). Vápenatý iont je zpravidla vázán koordinačně-kovalentní vazbou, síla vazby je velice různá a pohybuje se v rozmezích disociačních konstant (k_D) od mM po nM (PESKO a RINGE 2004). Vápenatý iont je v proteinech vázán zpravidla kyslíkem karboxylové skupiny postranního řetězce aminokyselin aspartátu nebo glutamátu nebo kyslíkem karbonylové skupiny hlavního řetězce, případně kyslíkem karbonylové skupiny postranního řetězce aminokyselin asparaginu nebo glutaminu (SCHWALLER 2001).

Proteiny vázající vápník se dělí do několika skupin: annexiny, C2 domény proteinů vázající vápník, pentraxiny, proteiny závislé na vitaminu K a EF-hand proteiny.

Rodina annexinů jsou proteiny vázající Ca²⁺ a fosfolipidy. Některé annexiny jsou proteiny činné v procesech intracelulárního vesikulárního přenosu, exocytosy a fúze endosomů, jsou substrátem pro proteinové kinasy C, jejichž činnost spolu s fosfolipasou A2 je patrně annexiny modulovaná, což

naznačuje, že annexiny mohou být činné v buněčné signalizaci. Jiné annexiny jsou lokalizovány vně buňky, ačkoliv neobsahují sekreční signální sekvenci. Annexiny se mohou účastnit, v závislosti na způsobu regulace, v progresi i potlačení tumorogeneze. Všechny tyto proteiny obsahují konservovanou repetitivní doménu zvanou „annexin fold“, který je tvořen pěti úseky α -helixů. Čtyři tyto domény obsahující okolo 70 aminokyselin, které tvoří jádro proteinu. Toto jádro proteinů annexinů obsahuje vazebná místa pro vápenaté ionty a záporně nabitě fosfolipidy. Afinita annexinů k vápníku roste v přítomnosti fosfolipidů.

Proteiny obsahující C2 doménu vázající vápník: C2 domény jsou součástí proteinové kinasy C závislé na vápníku, kde působí regulačně na tuto proteinovou kinasu C. C2 doména se dále nachází i ve fosfolipase C a fosfolipase A2. C2 domény vázající vápník se vyskytují v proteinech synaptogramech, které jsou zapojeny ve vesikulárním transportu. Podobně jako u annexinů, u C2 domén stoupá afinita k vápníku v přítomnosti fosfolipidů. C2 domény proteinů vázající vápník obsahují okolo 130 aminokyselin, které tvoří kompaktní strukturu antiparalelních β -listů. Ca^{2+} je vázán smyčkami, které propojují β -listy. Ca^{2+} je vázán postranními řetězci aspartátů, ale také karboxylovými skupinami postranních řetězců serinu a threoninu.

Pentraxiny se dělí do dvou skupin: sérové amyloidy P, které mají také vysokou afinitu k fosfolipidům, a C-reaktivní proteiny. Pentraxiny patří mezi periferní membránové proteiny. Každý protein je tvořen dvojicí pentamerů, přičemž každý pentamer váže 10 vápenatých iontů.

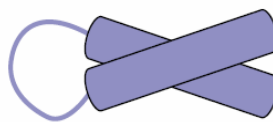
Proteiny závislé na vitaminu K obsahují v N-koncové Gla doméně 9-13 gama-karboxyglutamátů (γ -Gla), který je schopen vázat Ca^{2+} silněji než glutamát. Tato karboxylace je katalysována enzymovým systémem, který je závislý na vitaminu K. Tyto Gla domény obsahují sérové proteiny účastnící se krevní koagulace. Podobně jako annexiny mají tyto proteiny afinitu k fosfolipidům.

EF-hand proteiny se dělí do skupin podle své enzymatické aktivity. V první skupině jsou proteiny, které na základě vazby vápníku dále interagují se svým cílovým proteinem, čímž pak modulují aktivitu cílového proteinu. Příkladem takového proteinu je kalmodulin, u něhož navázání vápenatých iontů

způsobuje změnu konformace, která umožňuje kalmodulinu interagovat s mnoha proteiny a modulovat jejich funkci. Proteiny druhé skupiny EF-hand proteinů vykazují enzymatickou aktivitu přímo závislou na navázání vápníku. K těmto proteinům patří např. calpain, calcineurin, aequorin a mnohé další. Třetí skupinou jsou proteiny, které působí jako vnitrobuněčné pufrы Ca²⁺ iontů (převzato z SCHWALLER 2001). Strukturou vazebného místa EF-hand proteinů se budu zabývat podrobněji v následující kapitole.

2.3.1 EF-hand – struktura vázající vápenaté ionty

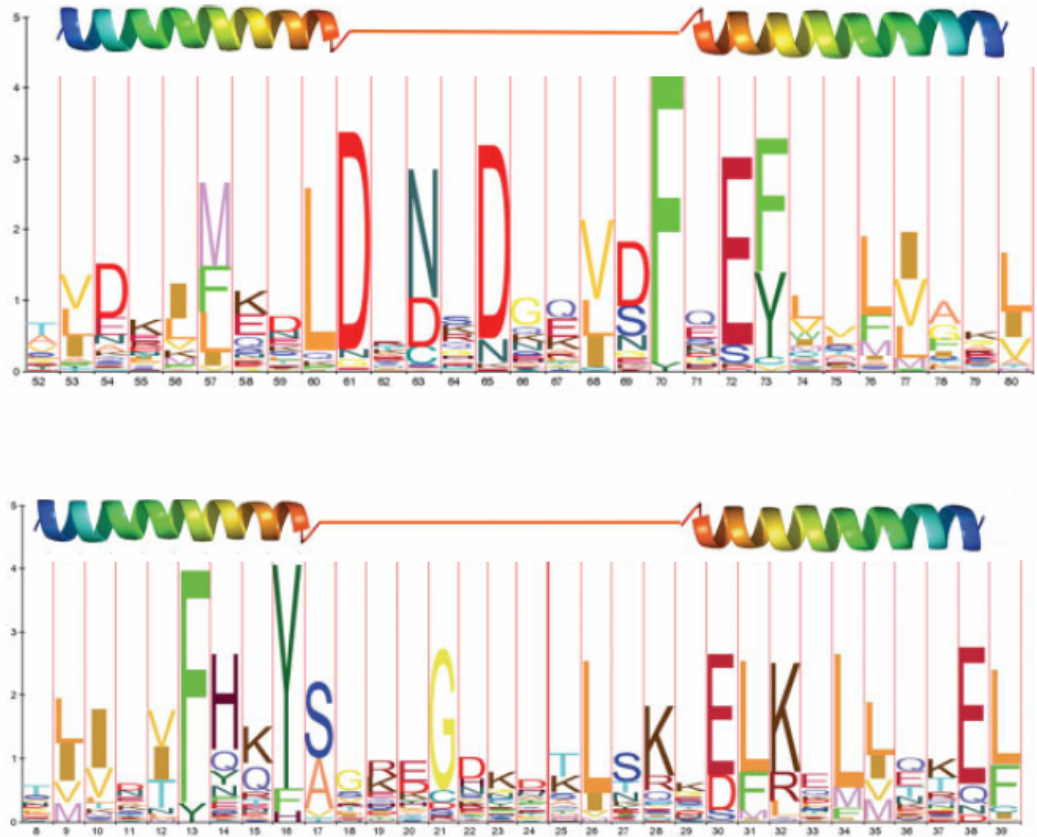
EF-hand je proteinová struktura vázající kovové ionty (vápník, hořčík) s vysokou selektivitou a s různou afinitou specifickou pro daný protein. EF-hand motiv se v proteinech vyskytuje mezi eukaryoty a také u eubakterií a archea, je rozdělen do dvou hlavních skupin: kanonických EF-hand struktur a pseudo EF-hand struktur. Struktura EF-handu je dána přítomností konkrétních aminokyselin na konkrétních pozicích tvořící za sebou motiv „helix-smyčka-helix“. Kanonický EF-hand motiv obsahuje 29 aminokyselin a je složen z alfa helixů E (zbytky 1-10) a F (zbytky 22-29), které obsahují okolo 10 aminokyselin a ohraničují smyčku (zbytky 10-21) EF-hand struktury (obr. 3). Pseudo EF-hand se od kanonického EF-handu liší počtem aminokyselin obsažených v jednotlivých strukturních motivech a pořadím aminokyselin ve smyčce, které koordinačně vážou vápenatý iont.



Obr. 3: Schematické znázornění EF-hand struktury helix-smyčka-helix (převzato z NELSON a CHAZIN, 2001).

Smyčka u kanonických EF-hand struktur obsahuje 12 a u pseudo EF-hand struktur 14 aminokyselin. Jsou zde obsaženy všechny aminokyselinové zbytky podílející se na koordinačně-kovalentní vazbě vápenatého iontu. Tyto aminokyseliny (viz obr. 4), z nichž každá má svou specifickou úlohu, váží iont

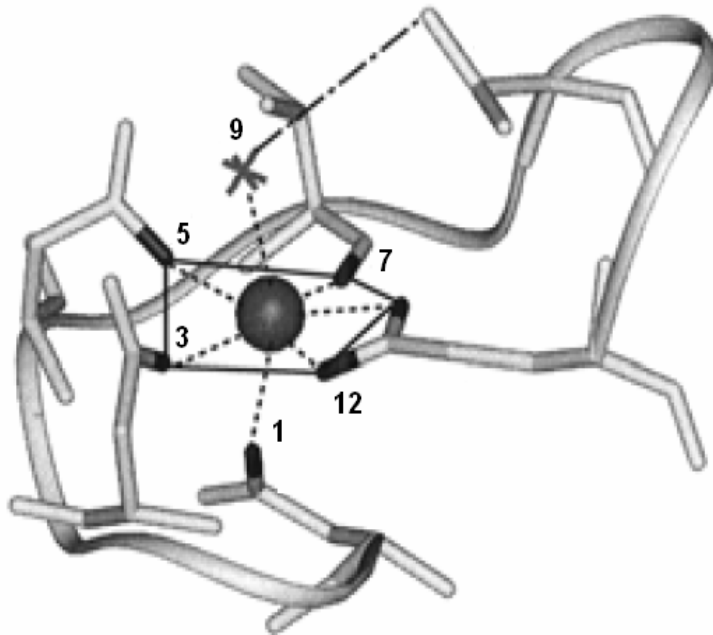
sedmi koordinačně-kovalentními vazbami v útvaru tzv. „pentagonální bipyramidy“ (obr. 5). Peptid o 14 aminokyselinách odpovídajících konsensu sekvence smyčky EF-hand struktury vázající kovový iont proteinů z rodiny obsahující kalmodulin je schopen sám o sobě vázat kovový iont (terbium, MACMANUS *et al.*, 1990).



Obr. 4: Konsensus sekvence kanonického „EF-hand“ (nahore) a „pseudo EF-hand“ (dole). Na ose x je pořadí aminokyselin v sekvenci dané EF-hand struktury. Na ose y je velikostí písmena značky aminokyseliny vyjádřena relativní entropie, kterou nabývá struktura díky přítomnosti dané aminokyseliny (převzato od ZHOU *et al.*, 2006).

Nejčastěji se koordinace iontu účastní asparagin, aspartát a glutamin svými postranními řetězci na pozicích 1, 3, 5, 7, 9 a 12 smyčky: kyslík postranních karboxylových skupin (na pozicích 1, 3, 5 a 12), kyslík karbonylové skupiny (na pozici 7). Jednu koordinační vazbu zajišťuje nepřímou vazbou aminokyselina na pozici 9, která k tomuto účelu váže molekulu vody

(cit. podle KAWASAKI *et al.*, 1998; NELSON a CHAZIN 1998; LEWIT-BENTLEY a RETY 2000; NELSON a CHAZIN 2001; YE *et al.*, 2001; MUKHERJEE *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2006).



Obr. 5: Schematické znázornění vazby vápenatého iontu strukturou EF-hand v tzv. pentagonální bipyramidě. Černá kulička uprostřed znázorňuje vápenatý iont, čísla označují pořadí aminokyselinového zbytku z celkových dvanácti zobrazených aminokyselin přítomných ve smyčce EF-handu (viz text, převzato z NELSON a CHAZIN, 2001).

Nejčastější uspořádání EF-hand struktury v proteinech vázajících vápník je dimer dvou sousedních EF-hand struktur.

Sekvence EF-hand motivu obsaženého ve FrpC proteinu *Neisseria meningitidis*, v pozici 521. aminokyseliny (první aminokyselina smyčky EF-hand motivu) a který byl použit v této práci pro zjišťování vlivu vápníku na FrpC protein, odpovídá konsensu kánonického EF-hand motivu (viz obr. 4).

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Přístrojové vybavení, chemikálie a ostatní materiál

3.1.1 Přístrojové vybavení

Elektroforesa Mini-PROTEAN II, Bio-Rad, Herkules, USA
Fluorescenční mikroskop Cell^R, Olympus IX 81, Hamburg, SRN
Konfokální mikroskop TCS SP2, Leica
Mrazící box (-20 °C), Zanussi, Řím, Itálie
Mrazící box (-80 °C), Jouan, Paříž, Francie
Odstředivka Biofuge pico, Heraeus Instruments, Heidelberg, SRN
Odstředivka Sorvall RC26+, Du Pont Instruments, New York, USA
Odstředivka Sorvall RC5C, Du Pont Instruments, New York, USA
pH-metr MV 870, Präzitronek, Berlin, SRN
Předvážky Nagema, OWA Labor, Berlin, SRN
Digitální váhy, Mettler, Bonn, SRN
Spektrfluorometr Fluoro Max 3, Jobin Yvon
Spektofotometr Beckman DU 530
Spektofotometr SECOMAM S.250I+, ALC-SECOMAM, Nice, Francie
Termostatovaná vodní lázeň typ U7C, VEB MLW, Mnichov, SRN
Termostatovaná vodní lázeň typ UH8, VEB MLW, Mnichov, SRN
Ultrasonikátor S3000, Misonix, New York, USA
Vortex MS 1, IKA-Works, Inc., New York, USA
Zařízení pro izolaci DNA (Lego-kit), TopBio, Praha, Česká republika
Zařízení pro DNA elektroforesu, MBÚ AV, Praha, Česká republika
Zařízení pro DNA elektroforesu, Bio-Rad, Herkules, USA
Zdroj pro elektroforesu, Vývojové dílny ČSAV, Praha, Česká republika

3.1.2 Seznam použitých chemikálií a ostatního materiálu

Agarosa pro DNA elektroforesu, Promega, Madison, USA
Akrylamid, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ampicilin, Biotika, Slovenská Lupča, Slovenská Republika
ANS (1-anilinonaphtalene-6-sulphuric acid), Invitrogen

Antibiotika (10 000 U/ml penicilin G, 10 mg/ml streptomycin a 25 µg/ml amphotericin B), 100x koncentrovaný roztok, Sigma-Aldrich, USA
β-merkptoethanol, Merck, Darmstadt, SRN
Bakteriologický agar, Oxoid, Hampshire, Anglie
Bakto-trytone, Oxoid, Anglie
BCA Protein Assay Reagent, Pierce
Bromfenolová modř, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BSA značené DY-547, Exbio, Vestec u Prahy
Coomassie Brilliant Blue G-250, Serva, Heidelberg, SRN
Coomassie Brilliant Blue R-250, Serva, Heidelberg, SRN
Dihydrogenfosforečnan draselný, Lachema, Neratovice, Česká republika
Dihydrogenfosforečnan sodný (dihydrát), Lachema, Neratovice, Česká republika
Dithiothreitol (DTT), Serva, Heidelberg, SRN
Dodecylsulfát sodný (SDS), Serva, SRN
DY-647, Dyomics
Ethanol, Lachema, Neratovice, Česká republika
Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), Serva, Heidelberg, SRN
Fetální hovězí sérum (FCS), Sigma-Aldrich, USA
Glycin, Serva, Heidelberg, SRN
Glukosa, Lachema, Neratovice, Česká republika
Glycerol, Lachema, Neratovice, Česká republika
Glycin, Serva, SRN
Hovězí sérový albumin (BSA), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hovězí sérový albumin (BSA), Pierce
Hydrogenfosforečnan sodný (heptahydrát), Lachema, Neratovice, Česká republika
Hydrogenuhličitan sodný, Lachema, Neratovice, Česká republika
Hydroxid sodný, Lachema, Neratovice, Česká republika
Chitin (IMPACT™ T7 System) New England Biolabs, Ipswich, USA
Chlorid amonný, Fluka, SRN
Chlorid draselný, Lachema, Neratovice, Česká republika
Chlorid hořečnatý, Lachema, Neratovice, ČR
Chlorid sodný, Lachema, Neratovice, Česká republika

Chlorid terbitý hexahydrát, Invitrogen
Chlorid vápenatý, Lachema, Neratovice, Česká republika
Isopropanol, Lachema, Neratovice, Česká republika
Isopropyl β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kvasničný extrakt, Oxoid, Hampshire, Anglie
Kyselina boritá, Lachema, Neratovice, Česká republika
Kyselina chlorovodíková, Lachema, Neratovice, Česká republika
Kyselina fosforečná, Lachema, Neratovice, Česká republika
Kyselina N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová (HEPES), Serva, SRN
Kyselina octová, Lachema, Neratovice, Česká republika
 λ -DNA, MBI Fermentas, Vilnius, Litva
L-glutamin, 3 % (w/v), Přípravna médií, Praha Dejvice
Laurdan, 2-dimethyl-6-lauroylnaftalen, Sigma
LysoTracker-red DND-99, Invitrogen
Methanol, Lachema, Neratovice, Česká republika
Močovina, Lachema, Neratovice, ČR
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED), Serva, SRN
N,N'-metylenbis-akrylamid, Serva, Heidelberg, SRN
Persulfát amonný (APS), Serva, SRN
Pyruvát, 1,1 % (w/v), Přípravna médií, Praha Dejvice
Sephadex G-25, Pharmacia, Praha, Česká republika
Sestava na izolaci DNA, Top-Bio, Praha, Česká republika
Síran amonný, Fluka
Standardy pro určování hmotnosti proteinů pro SDS-PAGE (High Range Molecular Weight Standards) o složení: myosin (205 kDa), β -galaktosidasa (116,5 kDa), fosforylasa (97,4 kDa), BSA (66,2 kDa), ovalbumin (45 kDa), anhydrasa (31 kDa), trypsin inhibitor (21 kDa) a lysozym (14 kDa); Bio-Rad, Herkules, USA
Transferrin značený FITC, Exbio, Vestec u Prahy
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), Serva, Heidelberg, SRN
Tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl), Serva, Heidelberg, SRN
2-merkptoethanol, Merck, SRN
2-(N-morpholino)ethanesulfonová kyselina (MES), Roth

Všechny použité chemikálie dosahovaly analytické čistoty.

3.1.3 Použité restriční endonukleasy

Tab.: Seznam použitých restričních endonukleas

Enzym	Zásahové místo ^a	Výrobce	Vhodný reakční NEB pufr ^b	Reakční teplota (°C)	Vyžaduje 0,01% BSA
BsrG I	T/GTACA	NEB, USA	2	37	ano
Sma I	CCC/GGG	NEB, USA	4	25	ne
Xba I	T/CTAGA	NEB, USA	4	37	ano
Xho I	C/TCGAG	NEB, USA	4	37	ano

^a Zásahové místo: sekvence rozpoznávaná příslušnou restriční endonukleasou

^b Složení reakčního NEB pufru je uvedeno v kapitole 3.1.5

3.1.4 Ostatní enzymy

Pankreatická ribonukleasa (RNasa), MBI Fermentas, Litva

T4 DNA-ligasa, MBI Fermentas, Litva s T4 DNA ligačním puftrem (10 x koncentrovaný, pH 7,5, 660 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP)

CIP fosfatasa (Calf Intestinal Phosphatase), MBI Fermentas, Litva

3.1.5 Použité roztoky a pufr

Složení jednotlivých NEB pufrů (New England Biolabs, USA), použitých při štěpení restričními endonukleasami:

NEB pufr 2 (10 x koncentrovaný):

pH 7,9 při 25 °C

Tris-HCl 100 mmol/l

MgCl₂ 100 mmol/l

NaCl 500 mmol/l

DTT 10 mmol/l

NEB pufr 4 (10 x koncentrovaný):

pH 7,9 při 25 °C

Tris-acetát	200 mmol/l
Acetát hořečnatý	100 mmol/l
Acetát draselný	500 mmol/l
DTT	10 mmol/l

Dále je uvedeno složení ostatních používaných pufrů a roztoků:

30% roztok akrylamidu pro SDS-PAGE:

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

Barvicí roztok pro SDS-PAGE:

Methanol	225 ml
Voda.....	225 ml
Kyselina octová.....	50 ml
Coomassie Brilliant blue G250.....	0,5 g

BFB (5 x koncentrovaný) :

Bromfenolová modř.....	0,25 % (w/v)
Glycerol.....	40 % (v/v)

Činidlo Bradfordové:

Coomassie Brilliant blue R250 .	0,01 % (w/v)
Ethanol.....	4,7 % (v/v)
H ₃ PO ₄	8,7 % (v/v)

HBSS s 1% glukosou:

pH 7,4

HEPES	10 mmol/l
NaCl	140 mmol/l
KCl	5 mmol/l
Glukosa.....	1 % (w/v)

MES pufr: pH 6,0

MES 20 mmol/l

NaCl 150 mmol/l

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE:

Methanol 250 ml

Voda 650 ml

Kyselina octová 100 ml

Rozdělovací (resolving) gel pro SDS-PAGE 7,5%: pH 8,8

30% roztok akrylamidu 1,24 ml

Destilovaná voda 1,8 ml

1 M Tris-HCl pufr (pH 8,8) 1,87 ml

10% SDS 50 μ l

20% APS 12,5 μ l

TEMED 12,5 μ l

Roztok I: pH 8,0

Glukosa 50 mmol/l

Tris-HCl 25 mmol/l

EDTA 10 mmol/l

Sterilizuje se autoklávováním (0,12 MPa, 20 minut). Uchovává se při 4 °C.

Roztok II:

NaOH 0,2 mmol/l

SDS 1 % (w/v)

Roztok III:

5 mol/l octan draselný 60 ml

Ledová kyselina octová 11,5 ml

Voda 28,5 ml

Uchovává se při 4 °C.

Roztok A (Pierce):

BCA.....	1 % (w/v)
Na ₂ CO ₃ .H ₂ O.....	2 % (w/v)
vínan sodný.....	0,16 % (w/v)
NaOH.....	0,4 % (w/v)
NaHCO ₃	0,95 % (w/v)

Roztok B (Pierce):

CuSO ₄ .5H ₂ O.....	4 % (w/v)
---	-----------

TBE pufr:

pH 8,3

Tris.....	90 mmol/l
kyselina boritá.....	90 mmol/l
EDTA.....	2 mmol/l

TE pufr:

pH 8,0

Tris-HCl.....	10 mmol/l
EDTA.....	1 mmol/l

TNE pufr:

pH 7,4

Tris-HCl.....	50 mmol/l
NaCl.....	150 mmol/l
EDTA.....	1 mmol/l

Tris-glycinový pufr:

pH 8,3

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

TUS pufr:

pH 8,0

Tris-HCl.....	50 mmol/l
Močovina.....	8 mol/l
SDS.....	1 mmol/l

Uchovávací roztok pro SDS-PAGE:

Methanol	25 ml
Voda.....	450 ml
Glycerol.....	25 ml

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE:

pH 6,8

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

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

Zaostřovací (stacking) gel pro SDS-PAGE 5 %:

pH 6,8

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

3.1.6 Použitá kultivační média

3.1.6.1 Kultivační média pro bakteriální kultury

3.1.6.1.1 Tekutá kultivační média

LB médium (Luria-Bertani medium):

Bacto-tryptone.....	10 g
Kvasničný extrakt	5 g
NaCl	10 g
Deionizovaná voda.....	ad 1000 ml

pH se upraví na 7,0 pomocí 5 M NaOH. Sterilizuje se autoklávováním (0,12 MPa, 20 minut).

MDO médium:

NaH ₂ PO ₄	1 g
Na ₂ HPO ₄	3 g
NH ₄ Cl	2 g
Na ₂ SO ₄	0,5 g
Thiamin	10 mg
Kvasničný extrakt	20 mg
Glycerol	20 mg
Deionizovaná voda	ad 1000 ml

pH se upraví na 7,0 pomocí 5 M NaOH. Sterilizuje se autoklárováním (0,12 MPa, 20 minut).

Médium s ampicilinem:

Připraví se médium (LB médium nebo MDO médium). Po sterilizaci a vychladnutí se k médiu přidá ampicilin do výsledné koncentrace 50 µg/ml nebo 150 µg/ml.

Takto připravená média se uchovávají při 4 °C.

3.1.6.1.2 Tuhá kultivační média

LB medium s ampicilinem:

Připraví se LB médium podle návodu uvedeného v části 3.1.6.1.1. Před sterilací se do média přidá 18 g/l bakteriologického agaru. Po sterilaci se médium vychladí na teplotu přibližně 50 °C, přidá se ampicilin do výsledné koncentrace 50 µg/ml nebo 150 µg/ml a po zamíchání se takto připravené médium používá na přípravu agarových ploten, které se uchovávají při 4 °C.

3.1.6.2 Kultivační média pro tkáňové linie

Médium RPMI (Roswell Park Memorial Institute):

K 450 ml média RPMI s NaHCO₃ (Přípravna médií, Praha-Dejvice) byl přidán L-glutamin (5 ml 3% L-glutaminu), glukóza (9 ml 25% glukózy), pyruvát (2,5 ml 1,1% pyruvátu), antibiotika (5 ml 100x koncentrovaného roztoku Sigma-Aldrich) a FCS (50 ml).

3.1.7 Použité plasmidy

pTYB2 (New England Biolabs, USA) nese gen pro rezistenci k ampicilinu a gen pro intein a chitin vazebnou doménu (CBD), kterému předchází polyklonovací místo a transkripční a translační iniciační signály genu 10 bakteriofága T7. Do polyklonovacího místa jsou klonovány geny, jejichž proteinové produkty jsou určeny k purifikaci pomocí IMPACT™ T7 systému na chitinové koloně.

pTYB2-*frpC*ΔRTX-int-CBD (OSICKA *et al.*, 2004, produkce FrpCΔRTX pro vazebné pokusy s terbiem)

pTYB2-*frpC-int*-CBD (OSIČKA, nepublikovaný konstrukt) (produkce FrpC pro endocytické pokusy)

pTYB2orf1Poc2-N-FLAG-*frpC*ΔRTX-C-His-int-CBD (produkce FrpCΔRTX pro vazebné pokusy s terbiem)

pTYB2orf1Poc2-N-FLAG-*frpC*ΔRTX-C-His-D521K-int-CBD (produkce FrpCΔRTX-D521K pro vazebné pokusy s terbiem)

3.1.8 Použité bakteriální kmeny

Bakteriální kmen *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, USA) *recA1 endA1 gyrA96 thi- 1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lac1^q ZΔM15Tn10(Tet^r)]* byl používán pro manipulaci plasmidových DNA.

Bakteriální kmen *E. coli* BL21(λDE3) (Novagen, USA) *F- ompT gal[dcM] [lon] hsdSB (r_B⁻m_B⁻; an *E. coli* B strain)* s DE3, λ profágem nesoucím gen pro T7 RNA polymerasu byl používán pro expresi proteinu FrpC bakterie *Neisseria meningitidis*.

3.1.9 Použité tkáňové linie

Pro mikroskopické studie byla používána myší makrofágová linie J774A.1 (ATCC - American Type Culture Collection, Catalog No. TIB-67, USA).

3.2 Metody a pracovní postupy

3.2.1 Uchovávání bakteriálních kmenů

Kmeny *E. coli* XL1-Blue, *E. coli* BL21(λDE3) byly krátkodobě uchovávány na agarových LB plotnách s příslušným antibiotikem při 4 °C. Dlouhodobě byly uchovávány zmražené v glycerolu (40% glycerol smíchaný s kulturou v tekutém LB médiu, narostlou do stacionární fáze, v poměru 1:1) při -80 °C.

3.2.2 Příprava kompetentních buněk *Escherichia coli*

Na tuhé LB médium byla nanesena suspenze buněk bakterie *E. coli* a kultivována (37 °C, 16-24 hodin). Jedna kolonie *E. coli* byla přenesena z tuhého LB média do 50 ml tekutého LB média, které bylo předeřáté na 37 °C. Buňky byly kultivovány při 37 °C za intenzivního třepání. Během kultivace byla měřena optická densita při vlnové délce 600 nm (OD₆₀₀). Jakmile OD₆₀₀ dosáhla hodnoty 0,3-0,4, byla kultura prudce ochlazená na 4 °C a centrifugována (6000g, 4 °C, 10 minut). Sediment byl resuspendován v 10 ml sterilního 0,1 M CaCl₂ o teplotě 4 °C. Po inkubaci ve 4 °C po dobu 15 minut byla buněčná suspenze centrifugována (6000g, 4 °C, 10 minut) a sediment byl opět resuspendován ve 2 ml 0,1 mol/l CaCl₂ o teplotě 4 °C. Kompetentní buňky byly uchovávány 24-48 hodin při 4 °C nebo byla jejich suspenze smíchána s roztokem 40% glycerolu v poměru 1:1 a uchovávána při teplotě -80 °C.

3.2.3 Transformace plasmidové DNA do kompetentních buněk

K 200 µl suspenze kompetentních buněk byly přidány 2 µl plasmidové DNA získané minipreparativní izolací, nebo 15 µl ligační směsi DNA, obsah byl opatrně, avšak důkladně zamíchán. Směs byla inkubována 20 minut při teplotě 4 °C a následně přenesena na 5 minut do vodní lázně o teplotě 37 °C a poté ochlazená v ledu. Po přidání 1 ml na 37 °C předeřátého tekutého LB média byla kultura inkubována 60 minut při 37 °C. Během této doby se plasmid uvnitř transformovaných buněk replikuje a zároveň dochází k produkci faktorů rezistence k určitému antibiotiku. V závěru celého procesu bylo vyseto

50-200 μ l suspenze na tuhé LB médium s příslušným antibiotikem. Buňky byly inkubovány 12-16 hodin při teplotě 37 °C.

3.2.4 Minipreparativní izolace plasmidové DNA metodou alkalické lyse

2 ml LB média s příslušným antibiotikem byly zaočkovány jednou bakteriální kolonií, která obsahovala plasmidovou DNA požadovanou k izolaci. Kultivace probíhala za intenzivního třepání 12-14 hodin při 37 °C. Bakteriální buňky byly od LB média odděleny centrifugací (10000g, 1 minuta, 20 °C) a resuspendovány ve 100 μ l roztoku I. Poté byly buňky lyzovány přídatkem 200 μ l roztoku II, s nímž byly mírně promíchány a umístěny na 5 minut do ledu. K lyzovaným buňkám bylo přidáno 150 μ l roztoku III, celý obsah byl promíchán a umístěn na 15 minut do ledu. Centrifugací (10000g, 15 minut, 4 °C) byly odstraněny zbytky buněčných struktur, vysrážené proteiny a chromozomální DNA. Supernatant byl převeden do nové mikrozkušavky a plasmidová DNA byla sražena stejným objemem izopropanolu (10 minut, 4 °C). Po centrifugaci (10000g, 15 minut, 4 °C) byl pelet sražené DNA promyt 1 ml 70% ethanolu, vysušen a rozpuštěn ve 40 μ l TE pufru pH 8,0 s termostabilní pankreatickou RNasou (20 μ g/ml). Směs byla inkubována 30 minut při 70 °C. Získaná plasmidová DNA byla dlouhodobě uchovávána při -20 °C.

3.2.5 Manipulace s plasmidovou DNA

3.2.5.1 Štěpení plasmidové DNA restrikčními endonukleasami

K 0,5-1 μ g DNA byly přidány 2 μ l 10 x koncentrovaného NEB pufru, zvoleného podle typu použité restrikční endonukleasy. U některých enzymů bylo nutné přidat 2 μ l 10 x koncentrovaného roztoku BSA. Reakční směs byla doplněna sterilní deionizovanou vodou tak, aby její výsledný objem po přidavku restrikční endonukleasy byl 20 μ l. Po promíchání byly přidány 1 až 2 U příslušné endonukleasy a vzorek byl inkubován ve vodní lázni o teplotě požadované daným typem enzymu po dobu 2-3 hodin.

Při štěpení DNA více enzymy najednou byl použit takový NEB pufr a zvoleny takové reakční podmínky, které byly vhodné pro všechny použité

enzymy. Při štěpení větších množství DNA bylo vhodným způsobem upraveno i množství ostatních reakčních složek.

3.2.5.2 Defosforylace 5'-konců lineární plasmidové DNA

Do mikrozkušavky obsahující 10 μ l naštěpené plasmidové DNA byl přidán 1 μ l 10 x koncentrovaného NEB 2 pufru a objem byl doplněn deionizovanou vodou do 19 μ l. Po promíchání byl přidán 1 μ l CIP alkalické fosfatasy (1 U), směs byla opětovně promíchána a inkubována při teplotě 37 °C po dobu 60 minut. Alkalická fosfatasa byla inaktivována 20 minut při teplotě 70 °C.

3.2.5.3 Ligace fragmentů DNA

2 μ l štěpeného vektoru byly smíchány s 8 μ l vkládaného DNA fragmentu (oba purifikovány z agarózového gelu), 3 μ l T4 DNA ligačního pufru a deionizovanou vodou, která byla doplněna do 29 μ l. Po promíchání byl přidán 1 μ l T4 DNA-ligázy (5 U) a reakční směs se nechala inkubovat 12 hodin při teplotě 20 °C.

3.2.5.4 Elektroforesa DNA fragmentů v agarosovém gelu

Podle velikosti dělených fragmentů byla pro elektroforesu v agarosovém gelu zvolena koncentrace agarosového gelu 0,6 % (w/v). Agarosový gel byl připraven smícháním příslušného množství agarosu s TBE pufrem, povařením směsi až do úplného rozpuštění agarosu a přidáním ethidium bromidu do výsledné koncentrace 0,5 μ g/ml. Takto připravená směs byla ochlazená přibližně na 50 °C a nalita do formy s vloženým hřebínkem. Po ztuhnutí agarosového gelu byl hřebínek vyjmut a nosná deska byla i s gelem vložena do aparatury pro elektroforesu. Aparatura byla dále doplněna TBE pufrem tak, aby hladina pufru byla asi 2 mm nad agarosovým gelem. Poté byly do jamek v gelu vzniklých po vyjmutí hřebínku nanášeny vzorky plasmidové DNA po štěpení restriktivními endonukleasami předem smíchané s 5 μ l 5x koncentrovaného roztoku BFB s bromfenolovou modří. Jako standard pro určení velikosti

fragmentů DNA byla do jedné jamky agarosového gelu nanášena λ DNA štěpená restriční endonukleasou Pst I.

Po nanášení vzorků byly fragmenty DNA při vloženém napětí 5 V/cm rozděleny podle svých velikostí. Velké fragmenty DNA byly zadržovány strukturou agarosového gelu více než fragmenty malé, proto se malé fragmenty DNA pohybovaly rychleji ke kladné elektrodě aparatury pro elektroforesu. Po rozdělení DNA fragmentů v agarosovém gelu byl gel z aparatury vyjmut a rozdělení DNA fragmentů s interkalovaným ethidium bromidem bylo sledováno při osvětlení zdrojem UV záření. U všech gelů byl pořízen elektroforeogram pomocí CCD kamery.

3.2.5.5 Izolace fragmentů DNA z agarosového gelu pomocí Lego kitu

Po elektroforéze byl požadovaný DNA fragment vyříznut pomocí skalpelu z agarosového gelu, smíchán s 900 μ l DNA vazebného pufru a umístěn na 10 minut do 55 °C. Po rozpuštění agarosy byl vzorek nanášen na minikolonku obsahující 150 μ l DNA vazebných partikulí a vystaven mírnému podtlaku. Navázaná plasmidová DNA byla dvakrát promyta jedním mililitrem promývacího roztoku a přebytek tohoto roztoku byl odstraněn centrifugací (10000g, 20 °C, 2 minuty). Plasmidová DNA byla uvolněna z náplně minikolonky přidávkem 40 μ l elučňího pufru předehřáté na 50 °C a centrifugací vždy 1 minutu (10000g, 20 °C). Získané DNA fragmenty byly uchovávány při teplotě -20 °C.

3.2.6 Produkce proteinu ve 2 ml kulturách

Produkce proteinu ve 2 ml kulturách byla použita pro ověření funkčnosti plasmidu jakožto expresního vektoru.

Bakterie *E. coli* BL21(λ DE3) byly transformovány plasmidem určeným k expresi požadovaného proteinu a inkubovány na LB plotnách s příslušným antibiotikem (ampicilin 50 μ g/ml). Druhý den byly jednou kolonií zaočkovány 2 ml LB média s příslušným antibiotikem (ampicilin 150 μ g/ml) a buňky byly inkubovány 16 hodin (přes noc) ve 37 °C. Z noční kultury bylo odebráno 50 μ l suspenze bakteriálních buněk, kterými zaočkováno čerstvé 2 ml LB médium s příslušným antibiotikem. Bakteriální kultura byla inkubována za nepřetržitého

třepání při teplotě 37 °C do optické density $OD_{600} = 0,6$. Poté byla produkce proteinu indukována přidavkem IPTG o výsledné koncentraci 1 mmol/l a kultura se nechala růst další 4 hodiny. Po uplynutí této doby byla kultura centrifugována (12 000g, 4 °C, 2 minuty) a pelet byl resuspendován ve 200 μ l TUS pufru. Následně bylo odebráno 20 μ l pro analýzu pomocí SDS-PAGE.

3.2.7 Produkce proteinu v 500 ml třepané kultuře

Bakterie *E. coli* BL21(λ DE3) byly transformovány plasmidem určeným k expresi požadovaného proteinu a inkubovány na LB plotnách s příslušným antibiotikem (ampicilin 50 μ g/ml). Druhý den byly přeneseny 2-3 bakteriální kolonie, které nesly plasmid s genem pro požadovaný protein, do 50 ml tekutého MDO média obsahujícího příslušné antibiotikum (ampicilin 150 μ g/ml). Bakterie *E. coli* byly kultivovány za intenzivního třepání 12-16 hodin (přes noc) při 37 °C. Z noční kultury bylo odebráno 5 ml suspenze bakteriálních buněk, kterými bylo zaočkováno čerstvé 500 ml MDO médium s příslušným antibiotikem (ampicilin 150 μ g/ml) předehřáté na 30 °C. Bakteriální kultura byla inkubována za intenzivního třepání při teplotě 30 °C do optické denzity $OD_{600} = 0,6$. Poté byla produkce proteinu indukována přidavkem IPTG o výsledné koncentraci 1 mmol/l a kultura se nechala růst další 4 hodiny. Kultivace bakterií byla ukončena prudkým ochlazením narostlé bakteriální kultury v ledové lázni. Pro analýzu vyprodukovaného množství proteinu v buňkách *E. coli* byl z narostlé bakteriální kultury odebrán vzorek (1 ml), který byl dále centrifugován (10000g, 20 °C, 1 minuta). Po odstranění supernatantu byl pelet buněk resuspendován ve 200 μ l TUS pufru. Následně bylo odebráno 20 μ l pro analýzu pomocí SDS-PAGE.

3.2.8 Příprava cytosolického extraktu

Buňky *E. coli* BL21(λ DE3) byly po expresi příslušného proteinu odděleny od kultivačního MDO média centrifugací (6000g, 20 minut, 4 °C) a dvakrát promyty ve 20 ml TNE pufru a centrifugovány (6000g, 20 minut, 4 °C). Po resuspendování peletu v dalších 20 ml TNE pufru byly buňky rozrušeny sonikací (4 x 30 sekund, 60 W, 4 °C), extrakt centrifugován (20000g, 20 minut,

4 °C) a supernatant obsahující příslušný protein ihned dále zpracováván, případně zamražen na -20 °C.

3.2.9 Purifikace proteinů afinitní chromatografií na chitinu pomocí systému založeném na inteinu

Na chromatografickou kolonu s 10 ml chitinových partikulí promytých 5-násobkem objemu deionisovanou vodou a ekvilibrovaných 5-násobkem objemu TNE pufrům byl nanesen cytosolický extrakt obsahující protein určený k purifikaci. Kolona byla promyta 8-násobkem objemu partikulí TNE pufrům. Indukce štěpení fúzního proteinu byla provedena 15 ml TNE pufru obsahujícího 50 mM DTT (dithiotreitol). Poté, co protéklo prvních 10 ml, byla kolona uzavřena a ponechána 16 hodin při 4 °C, aby se rozštěpil protein od intein-CBD (chitin binding domain). Poté byl jímán odštěpený protein vytékající z kolony a jeho eluce byla dokončena přidávkem TNE pufru. Přítomnost proteinu byla v každé frakci zjišťována orientačním testem podle Bradfordové (10 µl frakce a 90 µl činidla Bradfordové) v mikrotitrační destičce. Čistota a celistvost proteinu v jednotlivých frakcích byla analyzována pomocí SDS-PAGE. Vzorek proteinu byl následně zbaven DTT a převeden do TNE pufru pomocí gelové permeační chromatografie na Sephadexu G-25 (pro mikroskopické pokusy) nebo dialýsou (pro vazebné pokusy s použitím terbia).

3.2.10 Převedení proteinu do požadovaného pufru gelovou permeační chromatografií na Sephadexu G-25

Vzorek proteinu (o maximálním objemu 4 ml na každých 15 ml náplně) byl nanesen na kolonu s 15-ml Sephadexu G-25, která byla ekvilibrovaná TNE pufrům, do kterého měl být protein pro další experimenty převeden. Protein byl eluován stejným pufrům a 0,5 ml eluční frakce byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE. Přítomnost proteinu byla v každé frakci zjišťována orientačním testem podle Bradfordové (10 µl frakce a 90 µl činidla Bradfordové) v mikrotitrační destičce.

3.2.11 Převedení proteinu do požadovaného pufru dialysou

Vzorek proteinu byl uzavřen v dialyzačním střívkku. Objem dialysovaného vzorku ku dialyzačnímu pufru byl zvolen 1:2000. Dialyza probíhala za stálého míchání po dobu 12-18 hodin při 4 °C.

3.2.12 Precipitace proteinu síranem amonným

Vzhledem k problémům při chromatografické izolaci (kontaminanta vázající terbiem) byla jako konečná metoda izolace rekombinantních proteinů FrpC Δ RTX a FrpC Δ RTX-D521K určených pro vazebné pokusy s terbiem zvolena precipitace síranem amonným.

Vzorek proteinu o objemu 1 ml byl uložen na ledu. V procesu precipitace – vysolování byly do zkumavky s proteinem přispávána malá množství krystalků síranu amonného do celkové koncentrace síranu amonného 2,5 M (zjištěno empiricky, hodnotícím kritériem byl vznik zákalu – sražený protein). Po každém přídávku byl protein opatrně promíchán a uložen na led. Mezi jednotlivými přídávky byly udržovány intervaly 10-15 minut. Po posledním přídávku byl protein ponechán na ledu dalších 30 minut. Poté byl vzorek centrifugován (30000g, 15 minut, 4 °C) a pelet resuspendován v 500 μ l MES pufru a skladován zamražen na -20 °C.

3.2.13 Stanovení koncentrace proteinu

3.2.13.1 Stanovení koncentrace proteinů s použitím sady BCA Protein Assay Reagent (Pierce)

Touto metodou je stanovena koncentrace proteinů pomocí bicinchoninové kyseliny (BCA). Postup stanovení odpovídal dodanému manuálu (Instructions, BCA Protein Assay Reagent). Koncentrace proteinů ve vodném roztoku byla kvantifikována spektrofotometricky (spektrofotometr Beckman).

Nejprve byla připravena série ředění BSA v rozmezí 10-100 μ g/ml, která byla použita jako kalibrační standard. K ředění byla použita voda. 50 μ l stanovovaného vzorku byl smíchán s 1 ml pracovního roztoku, který byl připraven smícháním roztoku A s roztokem B dle dodaného návodu, a

inkubován 30 minut při 37 °C. Po zchlazení na teplotu 20 °C byla u vzorků změřena absorbance při 562 nm. Jako referenční vzorek byl použit vzorek bez proteinů (destilovaná voda), který byl ošetřen stejně jako ostatní vzorky. Koncentrace proteinů byla odečtena ze standardní kalibrační křivky pomocí BSA standardů.

3.2.13.2 Stanovení koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové

Metody podle Bradfordové (BRADFORD 1976) bylo použito pro stanovení koncentrace FrpC proteinu značeného fluorescenční sondou Dyomics DY-647, protože při použití alternativního stanovení proteinů pomocí bicinchoninové kyseliny (BCA, Pierce) docházelo ke vzniku sraženiny patrně interakcí fluorescenční sondy s některou složkou roztoku BCA Protein Assay Reagent (Pierce).

Nejdříve byla v rozmezí 10-100 µg/ml připravena série ředění BSA, který byl použit jako kalibrační standard. K ředění byl použit stejný pufr jako k přípravě měřeného vzorku. Poté bylo ke 100 µl jednotlivých ředěných standardů, 100 µl vzorku a 100 µl samotného pufru (referenční standard) přidáno 900 µl činidla Bradfordové. Vzorky byly promíchány a inkubovány při teplotě 20 °C po dobu 15 minut. Absorbance série standardů a měřeného vzorku byla měřena proti referenčnímu standardu při vlnové délce 595 nm. Nakonec byla stanovena koncentrace proteinu ve vzorku odečtením z proměřené kalibrační křivky.

3.2.14 Elektroforesa v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

K 20 µl vzorku proteinu bylo přidáno 5 µl vzorkového pufru určeného pro elektroforézu v SDS-polyakrylamidovém gelu. Po zahřátí na 100 °C po dobu 5 minut byly takto připravené vzorky nanášeny na gel, sestávající ze zaostřovacího 5% gelu a ze 7,5% rozdělovacího gelu. Po proběhnutí elektroforézy (8 V/cm² pro zaostřovací gel a 15 V/cm² pro rozdělovací gel) v tris-glycinovém pufru byl odstraněn zaostřovací gel a rozdělené proteiny byly vizualizovány barvicím roztokem pro SDS-PAGE s Coomassie Brilliant blue G250 po dobu 1 hodiny (mírné třepání, 20 °C). Poté byl rozdělovací gel odbarven odbarvovacím roztokem pro SDS-PAGE (2 x 20 minut, mírné třepání,

20 °C), promyt destilovanou vodou a vysušen v celofánové fólii. Pro porovnání molekulové hmotnosti rozdělených proteinů byl použit standard molekulových hmotností (High Range Molecular Weight Standards).

3.2.15 Stanovení enzymatické aktivity FrpC proteinu

Pro stanovení enzymatické aktivity FrpC proteinu – autokatalytické štěpení závislé na přítomnosti vápenatých iontů – byl vzorek proteinu o objemu 20 µl inkubován s roztokem CaCl₂ o koncentraci 2 mM nebo s roztokem TbCl₃ o koncentraci 200 µM po dobu 60 minut při teplotě 20 °C. Při této inkubaci došlo k rozštěpení proteinu a následnému propojení fragmentů za vzniku molekul o nižší i vyšší molekulové hmotnosti oproti původnímu proteinu. Dále byl vzorek zpracován jako vzorek pro SDS-PAGE.

3.2.16 Značení FrpC proteinu fluorescenční sondou Dyomics DY-647

Pro značení FrpC proteinu byl protein dialyzačně převeden z TNE pufru (3 ml) do karbonátového pufru s EDTA (100 mM NaHCO₃, 1 mM EDTA, pH 8,3). K proteinu byla přidána fluorescenční sonda Dyomics DY-647 ve výsledné koncentraci 10 µg/ml. Značení probíhalo za stálého míchání 90 minut při teplotě 20 °C. Volné molekuly fluoroforu byly od proteinu odděleny gelovou permeační chromatografií na Sephadexu G-25.

3.2.17 Stanovení vazebných míst pro ionty terbia – titrace FrpCΔRTX proteinů roztokem chloridu terbitého – TbCl₃

3.2.17.1 Terbium

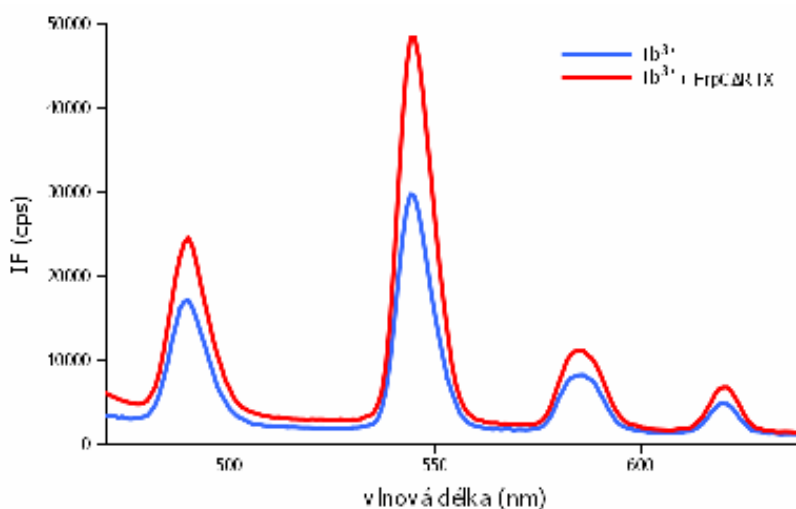
Terbium (⁶⁵Tb) je kovový prvek náležící do skupiny vnitřně přechodných prvků, lanthanoidů (obr. 6). Spolu s dalším lanthanoidem, europiem (Eu³⁺), jsou tyto prvky používány jako luminiscenční analogy vápenatých iontů (Ca²⁺) schopné vázat se do vápníkových vazebných míst na proteinech (WALLACE *et al.*, 1982; HOGUE *et al.*, 1992; LAKOWICZ 2006). Molekuly vody ve vodných rozpouštědlech, ve kterých jsou soli terbia dobře rozpustné, působí zhášení luminiscence terbia (fosforescence). Po navázání iontu terbia na protein dochází k odstínění terbia od molekul vody, terbium není vodou zhášen, roste

jeho kvantový výtěžek (QY, quantum yield, poměr zářivých přechodů ku všem přechodům) a intenzita fosforescence. Lanthanoidy mají charakteristicky nízký molární extinkční koeficient (ϵ [$M^{-1}cm^{-1}$], konstanta udávající absorpci dané látky za daných podmínek pro určitou vlnovou délku), proto je výhodné excitovat atomy terbia navázané na protein nikoliv přímo, ale nezářivým rezonančním přenosem energie (FRET, Foerster Energy Resonance Transfer) z některé z aminokyselin (Trp, Tyr, Phe jako fluorofory (LADOKHIN 2000)), jsou-li přítomny v dostatečné blízkosti ve vázajícím proteinu. Nejsou-li, je možné excitovat terbium přímo, nejlépe zářením o vlnové délce $\lambda = 240$ nm. Excitační spektrum terbia je závislé na pH prostředí (MILLER *et al.*, 1986). Po absorpci terbium emituje fotony přechodem mezi f orbitaly s polohami emisních maxim o vlnových délkách od 480 nm do 700 nm (obr. 7).

Lanthanoidy	57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb
Aktinoidy	89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No

Obr. 6: Periodická tabulka prvků zobrazující skupiny lanthanoidů a aktinoidů, terbium je zeleně vyznačené. Převzato z:

www.bpc.edu/mathscience/chemistry/images/periodic_table_of_elements.jpg



Obr. 7: Emisní spektrum Tb^{3+} při excitaci vlnovou délkou $\lambda = 240$ nm. Emise volného terbia ve vodném prostředí (modře) a terbia vázaného na FrpC Δ RTX protein ($TbCl_3$ 2 mM ve vodě).

3.2.17.2 Titrace proteinu roztokem chloridu terbitého a měření emisních a excitačních spekter terbia

Při titraci proteinu roztokem chloridu terbitého byly k proteinu (o koncentraci 2 µg/ml) ve 2 ml MES pufru postupně přidávány různé objemy roztoků terbia o různých koncentracích, aby celková koncentrace Tb³⁺ nabývala zvolených hodnot od 0 do 2 mM (počáteční nejmenší koncentrace terbia byla obvykle 1 µM). V jednotlivých krocích titrace byla měřena intenzita fosforescence (IF) v emisním maximu o poloze $\lambda = 545$ nm při excitaci vlnovou délkou $\lambda = 240$ nm na spektrofluorometru Fluoro Max 3 (Jobin Yvon). Při těchto měřeních byl v emisním kanálu použit cut-off filtr (405 nm LP-long pass, nepropouštějící světlo o vlnových délkách nižších než 405 nm), aby byl eliminován škodlivý vliv rozptylu vyšších řádů. Měření následovalo zhruba 1 minutu po přidavku, vzhledem k tomu, že vazba terbia na protein má určitou kinetiku a maximální intenzity je dosaženo právě nejdříve po jedné minutě. Delší prodleva byla nežádoucí, protože v přítomnosti iontů terbia byly FrpCARTX proteiny štěpeny, což ovlivňuje momentální vazbu nových iontů terbia zcela neznámým způsobem.

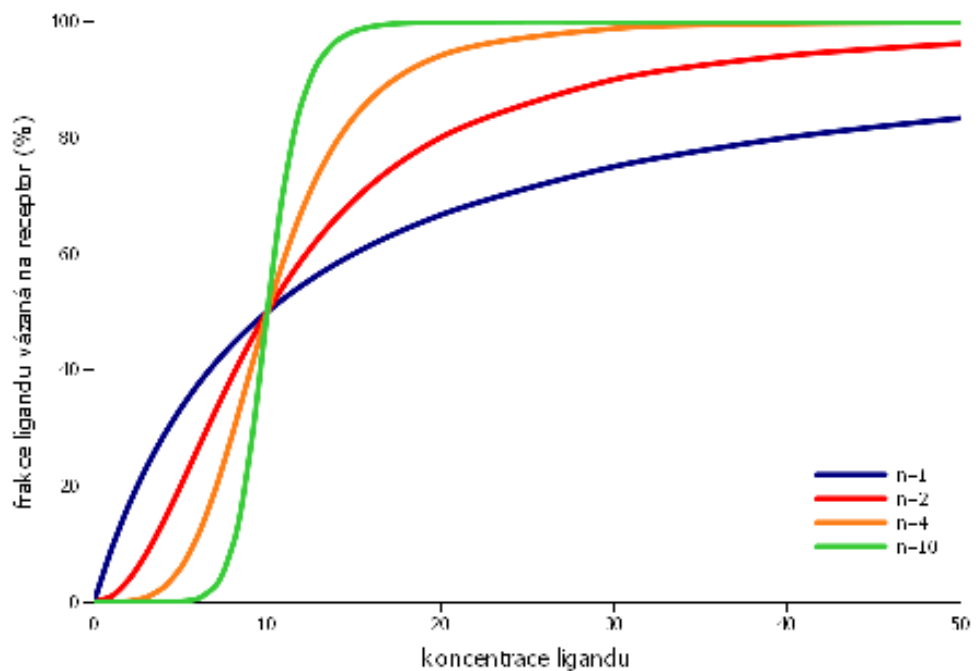
3.2.17.2.1 Vyhodnocování titračních křivek Hillovou funkcí

Hillova funkce popisuje vazbu ligandu na jeho receptor. Pomocí Hillovy funkce lze do grafu vynést frakci ligandu vázaného na receptor jako funkci koncentrace ligandu. Na tvaru vzniklé křivky se zásadně měrou podílí faktor kooperativity vazby, pojmenovaný jako Hillův koeficient (obr. 8). Rovnice má tvar:

$$y = \frac{[c]^n}{[c]^n + k_D^n} \quad (1)$$

kde y je frakce ligandu vázaná na receptor, $[c]$ je koncentrace ligandu, k_D je disociační konstanta ligandu a n je Hillův koeficient udávající míru kooperativity vazby ($n > 1$ pro pozitivní kooperativitu, kdy jeden navázaný ligand zvyšuje afinitu pro ostatní ligandy, $n < 1$ pro negativní kooperativitu, kdy jeden navázaný

ligand snižuje afinitu pro ostatní ligandy a $n=1$ pro nekooperativní vazbu ligandu).



Obr. 8: Grafické zobrazení Hillovy funkce: frakce ligandu navázaného na receptor (%) jako funkce koncentrace ligandu. Vazebné křivky mají stejnou disociační konstantu (k_D) a rozdílné hodnoty kooperativity vazby (n). Graf byl vytvořen v tabulkovém procesoru Gnumeric, hodnoty křivek byly vypočítány podle Hillovy funkce.

Pro vyhodnocení dat z titrací proteinů terbitými ionty byly jednotlivé hodnoty intenzity fosforescence reprezentující frakci ligandu vázanou na receptor korigovány odečtením hodnoty pozadí a vyneseny do grafu jako funkce koncentrace terbia. Předpokladem použitelnosti modelu Hillovy funkce pro výpočet vazebných parametrů terbitých iontů na FrpC Δ RTX protein je to, že každý iont terbia je na protein vázán stejným způsobem, a stejnou měrou je také navázáním na protein odstíněn od molekul vody a vykazuje stejnou emisi. Pomocí programu QtiPlot (OS Linux) byla tato data vyhodnocena: program QtiPlot proložil naměřená data Hillovou funkcí a z podoby funkce vypočítal hodnoty disociační konstanty (k_D) a kooperativity (n), vztažené k určitému maximu emise pro dané měření. Toto vyhodnocení bylo použito pro titraci proteinů chloridem terbitým.

3.2.17.3 Vytěsnění iontů terbia z proteinů vápenatými ionty – titrace komplexu protein-terbium roztokem chloridu vápenatého

Titrace komplexu FrpC Δ RTX-Tb³⁺ a FrpC Δ RTX-D521K-Tb³⁺ roztokem chloridu vápenatého byla realizována postupnými přídávky chloridu vápenatého o různých objemech a koncentracích zásobních roztoků (10, 100, 1000 mM) ke komplexu protein-terbium (jako u GROSS *et al.*, 1987; HOFMANN *et al.*, 1988). Koncentrace proteinů byla 2 μ g/ml, koncentrace terbia 200 μ M, měření probíhalo ve 2 ml MES pufru. Finální koncentrace Ca²⁺ nabývala hodnot od 10 μ M do 10 mM pro FrpC Δ RTX-Tb³⁺ a od 13 mM do 50 mM pro FrpC Δ RTX-D521K-Tb³⁺. V jednotlivých krocích titrace byla měřena intenzita fosforescence (IF) v emisním maximu o poloze $\lambda = 545$ nm při excitaci vlnovou délkou $\lambda = 240$ nm na spektrofluorometru Fluoro Max 3 (Jobin Yvon). Po každém přídávku byl obsah kyvety promíchán.

3.2.17.3.1 Vyhodnocení odstranění iontů terbia z proteinů ionty – modifikované Stern-Volmerovo vynesení

Stern-Volmerova rovnice je využívána pro metody zhášení fluorescence. S předpokladem fyzického kontaktu fluorescenční sondy a jejího zhášeče a se znalostí vstupních parametrů (koncentrace zhášeče, intenzity fluorescence, ...) lze vyšetřit zhášecí konstanty a typ zhášení (dynamické zhášení, statické zhášení nebo jejich kombinace). Modifikací (reciprokým vynesením) Stern-Volmerovy rovnice lze z experimentálních dat odečíst frakci fluoroforu dostupnou pro zhášeč.

Ačkoliv při vytěsňování iontů terbia z proteinů ionty vápníku nedochází k jevu zhášení fluorescence v pravém smyslu slova, je možné použít modifikované Stern-Volmerovo vynesení pro zjištění frakce terbitých iontů dostupných pro vytěsnění vápenatými ionty. Je-li iont terbia vytěsněn vlivem vápenatého iontu z místa na proteinu, kde byl navázán, jeho fosforescence klesá, neboť se z místa odstíněných od molekul vody ocitl v místě, kde je molekulami vody obklopen a v důsledku tedy zhašen (LAKOWICZ 2006).

Modifikovaná Stern-Volmerova rovnice:

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_a K_a [Q]} + \frac{1}{f_a} \quad (2)$$

kde F je intenzita fosforescence, F_0 je počáteční intenzita fosforescence, f_a představuje frakci sondy dostupnou pro zhášec, K_a je zhášecí konstanta frakce sondy dostupné pro zhášení, $[Q]$ je koncentrace zhášedce, byla použita pro vyhodnocení dat vytěšňování terbitých iontů z proteinu vápenatými ionty. Podíl počáteční intenzity fosforescence a rozdílu počáteční a okamžité intenzity fosforescence byl vynášen jako funkce převrácené hodnoty koncentrace vápníku. Průnik této funkce s osou y je roven $1/f_a$, tedy převrácené hodnotě frakce terbia dostupného pro vytěsnění vápenatými ionty. Výhodou modifikovaného Stern-Volmerova vynesení je to, že koncentrace zhášedce je zde zobrazena v převrácené hodnotě (osa x). To dovoluje odhadnout chování systému při maximální koncentraci zhášedce, které v praxi nelze dosáhnout.

3.2.18 Měření anizotropie fluorescence tryptofanu FrpC Δ RTX proteinu

Anizotropie fluorescence je metoda, která slouží ke zjišťování rotace molekuly v jejím prostředí: molekula v roztoku rotuje způsobem, který je charakteristický pro tuto molekulu v konkrétním prostředí (teplota, viskozita). Principem metody je, že absorbuje-li fluorofor (buďto emitující molekula proteinu vlastní – například tryptofan přítomný v proteinu, nebo fluorescenční sonda navázaná na molekulu proteinu) polarizované světlo, světlo emitované tímto fluoroforem je také polarizované. Pokud molekula v roztoku rotuje, rovina polarizace světla emitovaného je od roviny absorbovaného světla otočena tak, nakolik je molekula potočena v časové lhůtě dané dobou života excitovaného stavu. Pokud nejsou excitační a emisní dipóly této molekuly rovnoběžné, je otočení roviny polarizace dáno i úhlem mezi oběma dipóly. Změna směru polarizace se měří jako množství světla emitovaného v rovině polarizace původní a kolmém k původní excitaci. Fluorofor může preferenčně absorbovat fotony kmitající v určitém směru, takové, jejichž směr polarizace odpovídá orientaci absorpčního dipólu. Anizotropii fluorescence (při absorpci vertikálně polarizovaným světlem) lze spočítat z výrazu:

$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2I_{VH}} \quad (3)$$

kde r je anizotropie fluorescence, I_{VV} je hodnota naměřené intenzity fluorescence v rovině vertikální a I_{VH} je hodnota naměřené intenzity fluorescence v rovině horizontální. Hodnota anizotropie fluorescence konkrétního fluoroforu vysvětluje stav molekuly – velikost, tvar proteinu, viskozitu plasmatické membrány a změnu stavu – přechod od relaxované struktury k rigidní.

Terbium nemůže být použito pro měření anizotropie fluorescence, protože nemá přesně definovaný absorpčně-emisní dipól.

V této diplomové práci byla měřena anizotropie fluorescence tryptofanů ve FrpC Δ RTX proteinu (celkový počet tryptofanů ve FrpC Δ RTX proteinu je 16) v přítomnosti a nepřítomnosti vápenatých iontů (200 μ M CaCl₂) při excitaci tryptofanu vlnovou délkou $\lambda = 295$ nm a sledování emise o vlnové délce $\lambda = 340$ nm. Proteiny FrpC Δ RTX a FrpC Δ RTX-D521K o koncentraci 20 nM byly v 2 ml MES pufru o pH 6,0 při teplotě 24 °C. Měření probíhalo za soustavného míchání magnetickým míchadélkem umístěným v kyvetě. Cílem tohoto měření bylo zjistit, zda u proteinů FrpC Δ RTX a FrpC Δ RTX-D521K dochází vlivem 200 μ M CaCl₂ ke změnám v konformaci, která se bude projevovat relaxací či rigidizací struktury proteinu (a tedy i změnou anizotropie fluorescence tryptofanu).

3.2.19 Perrinovo vynesení

Perrinovo vynesení je metoda založená na měření anizotropie fluorescence zkoumané molekuly a její sledování při změně podmínek v okolí (teplota a viskozita), kdy se předpokládá, že dochází ke změnám charakteristiky molekuly, rotace molekuly. Za předpokladu, že molekula má kulový profil, lze vypočítat velikost molekuly, tedy charakteristický objem zaujímaný molekulou v přítomnosti a nepřítomnosti ligandu – vápenatých iontů, což bylo cílem tohoto pokusu. Perrinovo vynesení je odvozeno z Perrinovy rovnice popisující anizotropii fluorescence fluoroforu, který se pohybuje v izotropním prostředí a rotuje. Rotaci popisuje rotační korelační čas (θ):

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{\tau}{\theta} \quad (4)$$

Modifikací této rovnice je vztah, kdy pro molekulu s kulovým profilem platí, že její rotační korelační čas je úměrný její molekulové hmotnosti (při znalosti viskozity okolí):

$$\theta = \frac{\eta V}{RT} = \frac{\eta M r}{RT} (\bar{v} + h) \quad (5)$$

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} + \frac{\tau RT}{r_0 \eta V} \quad (6)$$

kde r je anizotropie, tzv. limitní anizotropie r_0 je anizotropie sondy v „zamrzlém“ prostředí, které úplně zabrání jejímu pohybu, τ doba života excitovaného stavu fluoroforu (s), θ rotační korelační čas molekuly (s), η viskozita (cP, jednotk viskozity centipoise, 1 P odpovídá $1 \text{ g.cm}^{-1}.\text{s}^{-1}$, nebo také 10 P odpovídá 1 Pascal.s (Pa.s), případně N.s.m^{-2}), V objem rotující molekuly (l), R plynová konstanta ($R=8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$), T teplota (K), \bar{v} specifický objem molekuly (l.g^{-1}), h hydratace molekuly (ml/g). Se znalostí experimentálně získané hodnoty anizotropie fluorescence a podmínek měření (doba života excitovaného stavu fluoroforu, viskozita, teplota) lze vypočítat objem molekuly.

Směrnice přímky zobrazující každé Perrinovo vynesení je rovna $\frac{\tau R}{r_0 V}$. V grafu

Perrinova vynesení je na ose y vynesena závislost převrácené hodnoty naměřené anizotropie fluorescence ($\frac{1}{r}$) na podílu teploty a viskozity ($\frac{T}{\eta}$)

vyjádřené v jednotkách ($\frac{^\circ\text{K}}{\text{cP}}$) (LAKOWICZ 2006).

V tomto pokusu byl protein značen fluorescenční sondou ANS ($5 \mu\text{M}$) vázající se nekovalentně na protein do jeho nepolárních oblastí. Protein byl měřen v prostředí 2 ml 50% glycerolu, ředěného MES puforem o pH 6,0. Byla měřena anizotropie fluorescence sondy ANS při měnící se teplotě v rozsahu od 5°C do 25°C . Byly měřeny dva vzorky: FrpC Δ RTX ve finální koncentraci $2 \mu\text{g/ml}$ značený sondou ANS v přítomnosti a nepřítomnosti 2 mM CaCl_2 .

3.2.20 Mikroskopické pozorování buněk

3.2.20.1 Příprava buněk

16 hodin před zahájením experimentu byly adherentní myší makrofágy linie J774.A1 staženy buněčnou škrabkou do RPMI média, suspenze buněk byla naředěna v novém RPMI médiu a buňky byly vysety na Petriho misky o průměru 3 cm. Buňky byly umístěny do CO₂ inkubátoru (37 °C, hladina CO₂ 5 %) a kultivovány do druhého dne.

3.2.20.2 Příprava preparátu pro mikroskopii

Petriho miska o průměru 3 cm s myšími makrofágy J774.A1 byla opláchnuta čerstvým RPMI médiem a umístěna na 2 minuty do inkubátoru (37 °C, hladina CO₂ 5 %). Poté byla opláchnuta HBSS (vše temperované na 37 °C). Takto připravený preparát byl dále použit pro inkubaci buněk s FrpC proteinem, případně s markery endocytických drah.

3.2.20.3 Inkubace buněk s FrpC proteinem a markery endocytických drah

Do Petriho misky s buňkami byl odměřen 1 ml HBSS s 1% glukosou předeřátého na 37 °C. Poté byl k buňkám přidán FrpC protein (pokud není uvedeno jinak) v konečné koncentraci 1,5 µg/ml.

Jako markery pro sledování endocytických drah byl použit transferrin značený FITC pro sledování endocytických drah závislých na clathrinu, BSA značené DY-547 pro sledování makropinocytosy a LysoTracker-red DND-99 pro značení lysosomů a pozdních endosomů. Markery byly použity v následujících koncentracích a dobách inkubace: BSA v koncentraci 50 µg/ml po dobu 10 minut, transferrin v koncentraci 25 µg/ml po dobu 20 minut, LysoTracker-red DND-99 v koncentraci 5 µM po dobu 30 minut.

V některých případech při sledování samotného FrpC proteinu byly membrány makrofágů označeny fluorescenční sondou Laurdan ve finální koncentraci 10 µM. Makrofágy byly se sondou Laurdan inkubovány během inkubace s FrpC proteinem.

Po inkubaci byly buňky opláchnuty čerstvým HBSS s 1% glukosou a sledovány v mikroskopu.

3.2.20.4 Sledování kolokalizace fluorescenčně značeného FrpC proteinu se značenými markery endocytických drah

Buňky byly sledovány fluorescenčním mikroskopem (Olympus IX 81, Cell^R Imaging Station (objektiv 60x/1.35NA UplanSApo, olejová imerze) nebo konfokálním mikroskopem (Leica TCS SP2, (objektiv 63x/1.4NA, HCX PL APO, olejová imerze). Byla sledována interakce FrpC proteinu s buňkou a stav po různě dlouhé inkubaci v inkubátoru (37 °C, hladina CO₂ byla 5 %).

Excitační vlnové délky jednotlivých fluorescenčních sond a rozsahy sledované emise byly (v závorce je uveden značený protein):

DY-647 (FrpC): λ_{ex} = 633 nm, λ_{em} = 640-800 nm;

DY-547 (BSA): λ_{ex} = 543 nm, λ_{em} = 550-610 nm;

FITC (transferrin): λ_{ex} = 488 nm, λ_{em} = 499-540 nm;

LysoTracker-red DND-99: λ_{ex} = 543 nm, λ_{em} = 550-610 nm;

Laurdan: λ_{ex} = 405X nm, λ_{em} = 415-460 a 460-540 nm.

3.2.21 *Ab Initio* predikce struktury proteinů (3D modelování) pomocí programu Rosetta++ 2.3.0

Ab Initio predikce struktury proteinů je jednou z metod molekulárního modelování proteinů. Na rozdíl od homologního modelování, které využívá sekvenční identitu modelovaného proteinu a proteinu s vyřešenou 3D strukturou, pracuje program Rosetta pouze s aminokyselinovou sekvencí. Homologní modelování je sice schopno předpovědět strukturu proteinu, je-li daný protein alespoň ze 40 % sekvenčně identický s některým z proteinů v databázi PDB (Protein Data Bank), ve které je v současnosti shromážděno přibližně 2000 proteinových struktur, není však vhodnou metodou pro modelování katalytických míst enzymů nebo pro zobrazení změny struktury vlivem navázání ligandu. Program Rosetta si zadaný peptid virtuálně rozdělí na krátké segmenty, jejichž sekvenci pak srovnává s knihovnou konformací podobných krátkých peptidových segmentů z databáze proteinů BLAST. Tato databáze obsahuje reálné konformace těchto krátkých segmentů. Program Rosetta každému krátkému segmentu přiřadí náhodně některou ze známých

konformací, která je theoreticky energeticky výhodná, virtuálně rozdělený peptid zase spojí a uloží jej jako jednu vygenerovanou strukturu („decoy“). Konformace celého modelovaného peptidu, která je předdefinovaná strukturou fragmentů z databáze, je řešena na základě pravděpodobnostní metody Monte Carlo (metoda založená na generování náhodných čísel) a vyhodnocení tzv. energetické funkce, která upřednostňuje kompaktní struktury s ukrytými hydrofobními zbytky. Takto vytvořené struktury, tzv. „decoys“, jsou vyhodnocovány na základě proteinového skóre a na základě jeho podobností (průměrná odchylka jednotlivých atomů na každé „decoy“ vůči každé jiné „decoy“) sloučeny do klastrů, v jejichž středu (zejména ve středu největšího klastru s nejvyšším skóre) se nachází předpokládaný nejvěrnější model proteinu

(<http://www.rosettacommons.org/tiki/tiki-index.php?page=Clustering+Scripts>).

Jelikož je alespoň 90 % původně generovaných „decoys“ špatných (zcela nereálných), je žádoucí vygenerovat co nejvíce počátečních struktur („decoys“). Nicméně rozlišování mezi „špatnými a správnými“ „decoys“ je stále předmětem výzkumu (BONNEAU *et al.*, 2001; PETSKO a RINGE 2004).

V této diplomové práci byl vybrán fragment FrpC proteinu obsahující předpokládané vazebné místo pro vápenaté ionty v pozici 521. aminokyseliny (a předpokládanou EF hand strukturu, OSICKA *et al.*, 2004), které bylo předmětem vazebných experimentů s terbiem, a jeho mutantní varianty FrpC–D521K. Cílem modelování bylo nalezení struktury fragmentů těchto proteinů a jejich vazebného místa pro vápník (které je sekvenčně homologní k motivu EF-hand struktury). Bodová substituce D521K snižuje autokatalytickou aktivitu FrpC proteinu (OSICKA *et al.*, 2004) i schopnost FrpC proteinu vázat ionty terbia. Vybraná sekvence obsahovala 50 aminokyselin (zbytky 502 - 551). Jednalo se tedy o dvě sekvence:

1) FrpC_502-551:

GDNIINAADA**AFQTLRVWQDLNQDGISQANELRTLEEL**GIQSLDLAYKDV
odpovídající „divokému“ typu FrpC proteinu.

2)FrpC-D521K_502-551:

GDNIINAADA**AFQTLRVWQKLNQDGISQANELRTLEEL**GIQSLDLAYKDV
odpovídající mutovanému FrpC-D521K proteinu.

V sekvencích je tučně je vyznačena pozice 521. Kurzívou a větším písmem je vyznačeno místo předpokládané EF-hand struktury, podtržena je předpokládaná smyčka mezi dvěma helixy podle (ZHOU *et al.*, 2006) obsahující 9 a 12 aminokyselin okrajových sekvencí helixů.

Sekvence vybraného proteinového fragmentu byla zadána ve FASTA formátu (text, kde první řádek obsahuje záhlaví, druhý řádek obsahuje zvolenou sekvenci) do aplikace sloužící ke generování vstupních dat pro Rosetta software na serveru <http://rosetta.bakerlab.org/fragmentsubmit.jsp>, kde byla pomocí skriptu, který prohledává BLAST databázi, vygenerována vstupní data – především databáze strukturních fragmentů a PSIPRED predikce sekundárních struktur pro Rosetta software (<http://www.rosettacommons.org/tiki/tiki-index.php?page=Fragments>):

```
aat000_03_05.200_v1_3, aat000_09_05.200_v1_3
```

(databáze strukturních fragmentů: 03/09 je velikost fragmentů (3- nebo 9-mer))

```
t000.dat
```

```
t000_.check
```

```
t000_.checkpoint
```

```
t000_.fasta – sekvence ve FASTA formátu
```

```
t000_.jufo_ss
```

```
t000_.psipred, t000_.psipred_ss2
```

(predikce sekundárních struktur)

```
t000_.rdb – SAM-T99 predikce
```

(Sequence Alignment and Modeling system, nástroje pro sekvenční analýsu)

Následně byl zadán soubor `paths.txt` jako argument procesů programu Rosetta, který odkazuje na umístění vstupních dat (<http://www.rosettacommons.org/tiki/tiki-index.php?page=empty+paths.txt+file>).

Na základě těchto dat byla na osobním počítači s dvoujádrovým procesorem (Intel Pentium Duo, operační paměť 2 GB), který je umístěn v naší laboratoři, spuštěna Rosetta++ 2.3.0 „*Ab Initio* Structure Prediction“ a bylo vygenerováno 9999 struktur („decoys“). Výpočet trval asi 8-14 dnů v závislosti

na vytiženosti výpočetní paměti. Spouštěcí příkaz pro interpret GNU Bash (Bash je unixový příkazový shell interpret, uživatelské rozhraní pro zadávání příkazů (BARRETT 2006), projektu GNU, což je projekt zaměřený na vývoj freeware, který je inspirován OS UNIX, GNU je rekurzivní zkratka a znamená „GNU's Not Unix“):

```
nice -19 rosetta.gcc aat000_ -nstruct 9999 -silent -paths \
paths.txt
```

V hranatých závorkách je vždy komentář k příkazu, který není součástí příkazu.

```
[“nice -19” spustí s nejnižší prioritou proces “rosetta.gcc”,  
“-nstruct” počet modelů od každé struktury “9999”, “-silent” bez  
výstupů .pdb v průběhu procesu-ukládá jen hodnoty  $\Phi$ ,  $\Psi$  úhlů,  
což je méně náročné na paměť počítače, do parametru “-paths”  
přiřadí argument “paths.txt” - upřesňuje umístění zdrojových a  
výstupních dat]
```

Jedním z výstupních dat je aat000.out (silent file) databáze vytvořených struktur.

Rosetta software dále umožňuje na vytvořené struktury navázat vápenaté ionty a umístit je do energeticky nejvýhodnějšího místa v blízkosti zvoleného aminokyselinového zbytku, kterým byl v tomto případě aspartát nebo lysin v pozici 20 zvolených fragmentů (FrpC_502-551 a FrpC-D521K_502-551). Postupně byl do struktur vázán 50x jeden vápenatý iont na každou z 9999 predikovaných struktur („decoys“). Navázání jednoho vápníku probíhá nezávisle na ostatních vápnících navázaných na totožnou strukturu.

Dříve vytvořené struktury byly nejprve extrahovány z databáze aat000.out; příkaz:

```
nice -19 rosetta.gcc -extract-all -s aat000.out -paths patha.txt
```

```
[“nice -19” spustí s nejnižší prioritou proces “rosetta.gcc”,  
“-extract-all” extrahují vytvořené struktury z databáze struktur
```

"-s aat000.out" (silent file), do parametru "-paths" přiřad argument "paths.txt" - upřesňuje umístění zdrojových a výstupních dat]

Ke strukturám, které v této fázi tvoří pouze základní řetězec peptidu bez postranních řetězců aminokyselin, byly přidány postranní řetězce aminokyselin a všechny vodíky a struktury byly relaxovány, aby v i celoatomovém modelu zaujímaly nejvhodnější konformaci (funkce programu Rosetta „Rosetta Relax“); příkaz:

```
for ALL_DECOYS in $( ls | grep ".pdb$" ) ; do
nice -19 rosetta.gcc -refold -score -fa_output -s \
$ALL_DECOYS -paths paths_relax.txt -nstruct 1
```

[“for ALL_DECOYS in \$(ls | grep ".pdb\$") ; do” pro každý záznam v aktuálním adresáři, který odpovídá regulárnímu výrazu ".pdb\$" (vyber databáze struktur) spust, “nice -19” s nejnižší prioritou proces “rosetta.gcc” s parametry “-refold -score” vytvoř soubor pro výsledky s jednotlivým skóre, “-fa_output”, ze záznamu, který je uložen v proměnné ALL_DECOYS “-s \$ALL_DECOYS”, do parametru “-paths” přiřadí argument “paths_relax.txt” - upřesňuje umístění zdrojových a výstupních dat, “-nstruct” počet modelů od každé struktury “1”]

<http://www.rosettacommons.org/tiki/tiki-index.php?page=Relax>

Ke každé struktuře (*.pdb souboru) byl přidán jeden iont Ca^{2+} . Konkrétně na konec *.pdb souboru byly připojeny následující řádky:

```
HETATM      1      Ca2p  CA      900      -0.728  2.510  8.592  1.00  0.00  Ca
CHARGE      2.000
TER
```

[podoba atomu Ca^{2+} ve formátu .pdb]

Poté se tento iont nechal 50x náhodně navázat na každou strukturu;
příkaz:

```
for ALL_DECOYS in $( ls | grep ".pdb$" ) ; do
nice -19 rosetta.gcc ca boun _ -dock -ligand -dock_mcm \
-nstruct 50 -dock_pert 30 30 0 -try_both_his_tautomers \
-use_input_sc -s ca-$ALL_DECOYS -paths paths_ca_bound.txt
```

[“for ALL_DECOYS in \$(ls | grep “.pdb\$”) ; do” pro každý záznam v aktuálním adresáři, který odpovídá regulárnímu výrazu “.pdb\$” (vyber databáze struktur) spust, “nice -19” s nejnižší prioritou proces “rosetta.gcc” s parametry, “ca boun” _ “-dock” “-ligand” “-dock_mcm” - naváže a umístí ligand, “-nstruct” počet modelů od každé struktury “50”, “-dock_pert” “30 30 0” souřadnice výchozí pozice v Å, “-try_both_his_tautomers”, “-use_input_sc”, ze záznamu, který je uložen v proměnné “-s ca-\$ALL_DECOYS”, do parametru “-paths” přiřadí argument “paths_ca_bound.txt” - upřesňuje umístění zdrojových a výstupních dat]

(<http://www.rosettcommons.org/tiki/tiki-index.php?page=Ligands>)

Tento ne zcela obvyklý přístup umožnil prozkoumat poměrně různé konformace peptidového řetězce v souvislosti se schopností vázat vápenaté ionty.

Jednotlivé struktury byly hodnoceny na základě nalezené „síly vazby“ vápníku (skore ligandu) a sloučeny do klastrů, z nichž byly vybrány vítězné struktury z nejpevněji vázajících struktur

(<http://www.rosettacommons.org/tiki/tiki-index.php?page=Full+Documentation>).

Vybrané struktury ve formátu *.pdb byly zobrazeny pomocí programu PyMol (GNU licence, <http://www.pymol.org>).

4 VÝSLEDKY

4.1 *Produkce a purifikace rekombinantního FrpC proteinu a jeho derivátů*

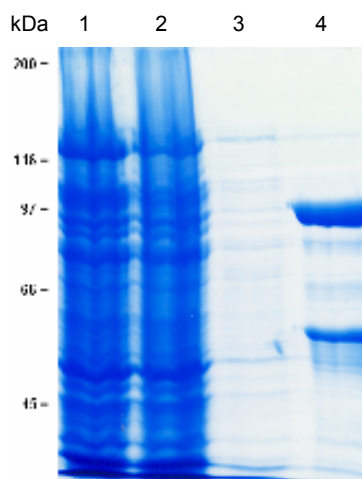
Rekombinantní FrpC protein a jeho deriváty: FrpC Δ RTX (FrpC protein bez RTX domény) a jeho mutovaná varianta FrpC Δ RTX-D521K (záměna aspartátu za lysin na pozici 521. aminokyseliny v proteinu) byly produkovány v *E. coli* BL21(λ DE3) po transformaci kompetentních buněk plasmidem nesoucím gen pro příslušný proteinový produkt.

Před samotnou produkcí FrpC Δ RTX a FrpC Δ RTX-D521K proteinů pro vazebné pokusy s terbiem bylo napřed nutné příslušné geny vyštěpit ze stávajících dvou plasmidů (pTYB2orf1Poc2-N-FLAG-*frpC* Δ RTX-C-His-int-CBD a pTYB2orf1Poc2-N-FLAG-*frpC* Δ RTX-C-His-D521K-int-CBD, viz 3.1.7) a vložit je do prázdného pTYB2 plasmidu, protože stávající plasmidy nesly ještě geny pro další proteinové produkty (FrpD protein), které by byly produkovány s požadovaným proteinem, byly by nežádoucí a pro vazebné pokusy s terbiem by mohly působit jako kontaminace vázající terbité ionty. N- koncová FLAG sekvence a C- koncový His tag přítomné na požadovaných proteinech nebyly pro vazebné pokusy s terbiem podstatné a neovlivňovaly výsledky dalších pokusů. Tyto plasmidy byly konstruovány za jiným účelem Dr. Osičkou, od kterého jsem tyto plasmidy obdržela.

Každý z uvedených plasmidů a vektor pTYB2 byly zvlášť inkubovány s restrikními endonukleasami (Xba I a BsrG I), které vyštěpily požadovaný gen z plasmidu a zároveň zanechaly na obou koncích vhodné kohesní konce pro následné spojení fragmentu s prázdným vektorem (viz kap. 3.2.5). Vektor pTYB2 byl po restrikním štěpení navíc opracován CIP fosfatasou, aby nedošlo k nežádoucímu spojování jeho volných konců. Fragменты vzniklé restrikním štěpením byly rozděleny elektroforesou v agarosovém gelu. Poté byly požadované fragmenty (*frpC* Δ RTX, *frpC* Δ RTX a linearisovaný pTYB2 vektor) z gelu vyříznuty skalpelem a izolovány za použití Lego kitu. Příslušné fragmenty byly inkubovány s prázdným vektorem a DNA ligasou, kdy došlo ke spojení fragmentu s vektorem na základě úplné komplementarity kohesních konců a ke kovalentnímu propojení obou konců. Plasmidy byly před produkcí

proteinů pomnoženy v *E. coli* XL1-Blue a podrobeny restriční analýze restričními endonukleasami BsrG I, Xba I, Sma I a Xho I pro kontrolu přítomnosti vkládaných fragmentů. Vlastní produkci v 500 ml kultuře předcházela pokusná produkce v 2 ml kulturách.

Kompetentní buňky *E. coli* BL21(ΔDE3) byly transformovány (kap. 3.2.3) plasmidy pro produkci FrpC a od FrpC odvozených proteinů, produkce proteinů probíhala při kultivaci v 500 ml MDO media (kap. 3.2.7) po indukci IPTG (1 mmol/l). K izolaci a purifikaci proteinů po předcházejícím rozrušení buněk sonikací a uvolnění proteinů do media byly použity afinitní chromatografie na chitinu pomocí systému založeného na inteinu připojenému k chitin vazebné doméně (CBD, ve všech případech izolace, viz kap. 3.2.9), na ní navazující gelová permeační chromatografie na Sephadexu G-25 (při izolaci FrpC proteinu pro mikroskopická pozorování, viz kap. 3.2.10) nebo dialýsa (ve všech případech purifikace, viz kap. 3.2.11) a v případě proteinů určených k vazebným pokusům s terbiem také precipitace proteinů síranem amonným, protože purifikace pomocí na kolonách s dextransy (chitin, Sephadex G-25) je závažným zdrojem kontaminace, která je schopná vázat terbium. Ve všech izolačních krocích byl odebrán kontrolní vzorek pro SDS-PAGE (obr. 9, viz kap. 3.2.14).

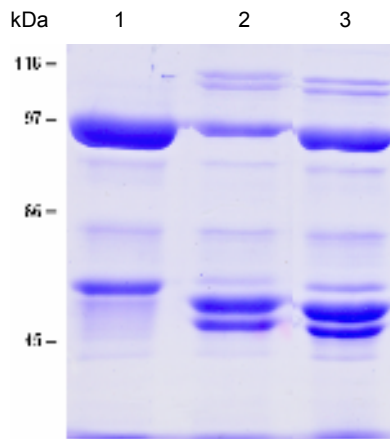


Obr. 9: Kontrolní gel (SDS-PAGE) znázorňující stav proteinů v jednotlivých krocích izolace FrpC Δ RTX proteinu: 1. buněčný lysát, 2. proteiny, které se nazachytily na chitinové koloně, 3. fáze promývání chitinové kolony-eluce, 4. FrpC Δ RTX protein po eluci z chitinové kolony.

4.2 Stanovení enzymatické aktivity FrpC Δ RTX proteinu

Protože biologická funkce FrpC proteinu i jeho struktura jsou stále neznámé, jedinou možností pro ověření funkčnosti proteinu po jeho purifikaci je vyšetření jeho schopnosti autokatalytického sestřihu v přítomnosti určité koncentrace vápenatých iontů (pro FrpC a FrpC Δ RTX se jedná o koncentraci CaCl₂ 2 mM (OSICKA *et al.*, 2004), mutantní forma proteinu, FrpC Δ RTX-D521K je štěpitelná pouze za řádově vyšší koncentrace CaCl₂, 20 mM). Každý nově izolovaný protein musel být tedy nejprve prověřen z hlediska funkčnosti autokatalytického štěpení závislého na vápníku, aby bylo jisté, že protein nebyl izolován jako denaturovaný vlivem špatného zacházení při izolaci či nevhodnými podmínkami skladování. Štěpení je nezávislé na RTX doméně FrpC proteinu. Produkty štěpení se v případě FrpC a FrpC Δ RTX liší pouze absolutní molekulovou hmotností. V případě FrpC Δ RTX proteinu z proteinu o molekulové hmotnosti 95 kDa vznikají fragmenty o molekulové hmotnosti okolo 45 kDa (rozštěpené fragmenty) a okolo 115 kDa (kovalentně svázané fragmenty vzniklé po autokatalytickém štěpení) (obr. 10). U všech vzorků byla stanovena enzymatická štěpící aktivita, jak je popsáno v 3.2.15.

Nejprve bylo nutné ověřit, zda je Tb³⁺ schopné nahradit Ca²⁺ jako přirozený ligand FrpC proteinu i v této jeho enzymatické aktivitě. Výsledky ukazují (obr. 10), že poloha fragmentů v případě štěpení indukovaného Ca²⁺ a Tb³⁺ je shodná, terbium se tedy váže na FrpC Δ RTX protein a je schopno indukovat autokatalytický sestřih FrpC proteinu i v řádově nižší koncentraci oproti vápníku. Na základě výsledků na obr. 10 lze tedy usuzovat, že ionty terbia se váží na FrpC Δ RTX protein se stejným efektem jako vápenaté ionty, kterým je autokatalytický sestřih FrpC Δ RTX proteinu.



Obr. 10: Kontrolní štěpení FrpC Δ RTX proteinu. FrpC Δ RTX protein byl po dobu 60 minut při teplotě 20 °C inkubován buď s CaCl₂ o finální koncentraci 2 mM, nebo TbCl₃ o finální koncentraci 200 μ M. Poté byl vzorek analysován pomocí SDS-PAGE (viz 3.2.14): Vysvětlivky: 1. neštěpený FrpC Δ RTX protein, 2. FrpC Δ RTX inkubovaný 60 minut s 2 mM CaCl₂, 3. FrpC Δ RTX inkubovaný 60 minut s 2 mM TbCl₃ – oba naštěpené. Je vidět, že při štěpení oběma typy iontů vznikají fragmenty o stejných molekulových hmotnostech.

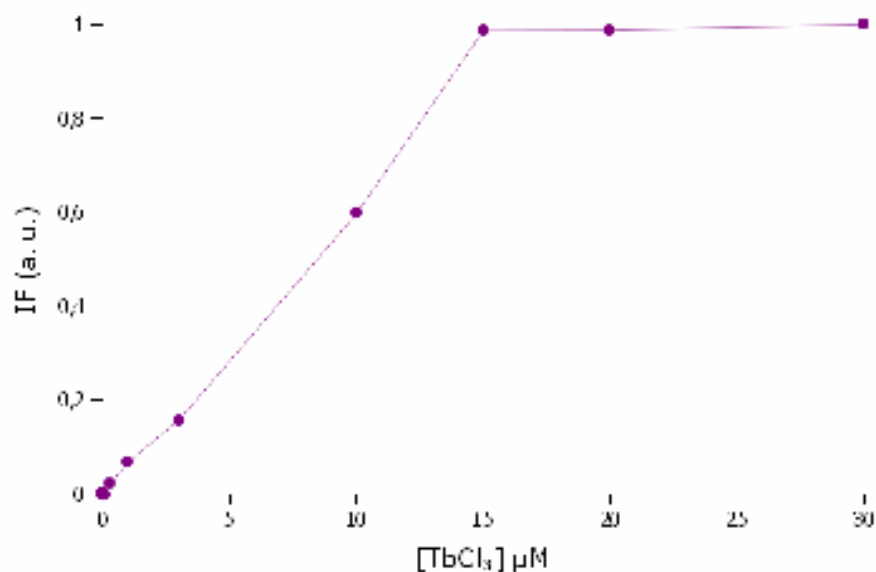
4.3 Stanovení vazebných míst pro ionty terbia – titrace

FrpC Δ RTX a FrpC Δ RTX-D521K proteinů roztokem chloridu terbitého

Cílem následujících vazebných pokusů s FrpC Δ RTX a FrpC Δ RTX-D521K a terbiem jako luminiscenčním ligandem nahrazujícím přirozený substrát/ligand FrpC proteinu, tedy vápník, bylo kvantitativně a kvalitativně charakterizovat vazebná místa pro terbité ionty na FrpC proteinu mimo RTX doménu. Jako příklad ovlivnění vazebného místa pro vápenaté ionty u FrpC Δ RTX byla zvolena jedna konkrétní mutantní forma FrpC proteinu – FrpC Δ RTX-D521K, u které je známý její vliv na snížení autokatalytické aktivity FrpC proteinu (OSICKA *et al.*, 2004). Předpokládáme, že daná substituce FrpC Δ RTX-D521K pravděpodobně ruší vazebné místo pro vápenaté ionty. Rozdíl ve vazebných parametrech mezi nemutovanou a mutantní formou FrpC Δ RTX proteinu je pak možné přičítat vlivu vazebného místa pro kovový iont na celkovou vazebnou kapacitu proteinu.

4.3.1 Kontaminace při izolaci proteinu znemožňující správnou charakterisaci vazebných parametrů FrpC Δ RTX proteinů

Prvotní data z vazebných pokusů s terbiem, jejichž cílem bylo nalézt disociační konstantu a kooperativitu vazby pro terbité ionty, nebyla v souladu s očekáváními. Charakter vazby, který byl předpokládán, měl odpovídat klasické závislosti vazby ligandu na receptor popsanému Hillovou funkcí: vazba s určitým disociační konstantou (K_D) vykazující určitou kooperativitu vazby ligandu (n) směřující k určitému konkrétnímu maximu (100 % navázaného ligandu na receptor), jak je uvedeno v 3.2.17.2.1. Na obr. 11 jsou zobrazena prvotní data, která ukazují zvyšující se intenzitu fosforescence terbia jako funkci koncentrace terbia. Terbium bylo vázáno při nízkých koncentracích s vysokou afinitou lineárně do limitní koncentrace, od které už ke zvyšování fosforescence terbia téměř nedocházelo.



Obr. 11: Titrace terbiem vázajících míst FrpC Δ RTX proteinu terbiem; intenzita fosforescence terbia jako funkce jeho koncentrace. K vyvázání veškerého terbia došlo v nízkých koncentracích terbia a dále již k navázání dalšího terbia nedocházelo. Koncentrace FrpC Δ RTX proteinu 5 μ g/ml.

Následující pokusy prokázaly, že ke zvyšování fosforescence terbia nedocházelo navázáním terbia na protein. Terbium bylo vázáno s vysokou afinitou na neznámou kontaminaci, která byla ve vzorku přítomna v řádově

vyšší koncentraci oproti FrpC Δ RTX proteinu. Výslednou křivku nebylo možné proložit odpovídající Hillovou funkcí.

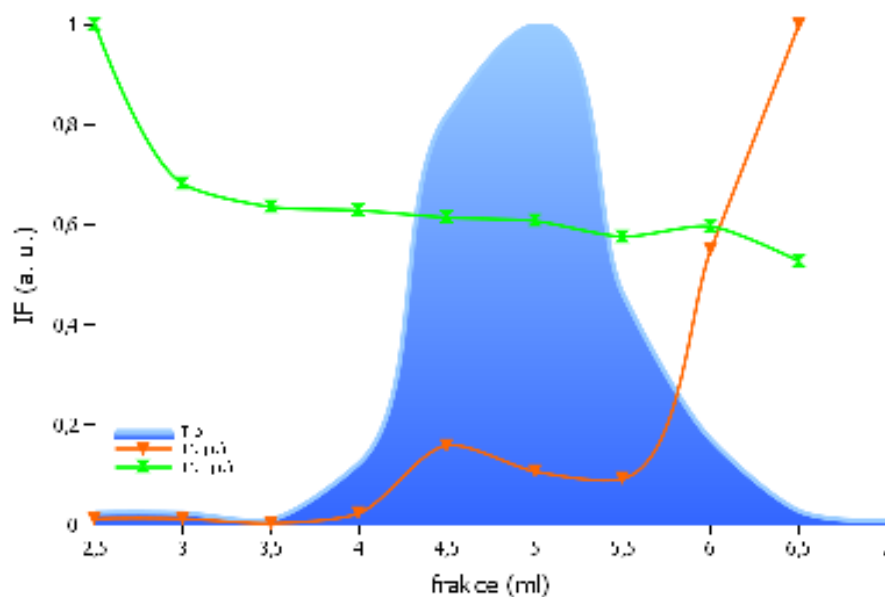
Při vyšších koncentracích terbia (od 100 μ M) byl v kyvetě patrný mléčně bílý zákal. Sama přítomnost tohoto zákalu značně omezovala reprodukovatelnost naměřených hodnot. Jako první možností vysvětlení zákalu a neočekávaných dat na obr. 11 bylo možné uvažovat o přítomnosti neznámé kontaminace o nízké molekulové hmotnosti, která je patrně navíc schopná vyvázat terbium a znemožnit tak specifickou vazbu na protein. V úvahu by zde přicházely například produkty *E. coli* vzniklé při produkci rekombinantního proteinu. Jiným zdrojem domnělé kontaminace by popřípadě mohla být izolace a purifikace proteinu na chitinové koloně nebo Sephadexu G-25 a eluce této látky spolu s proteinem, ačkoliv všechny tyto chromatografické kolony byly připravovány správně a dle návodu. Je známo, že chitin je schopen vázat ionty těžkých kovů, tedy i terbia (MUZZARELLI *et al.*, 1972).

Protože nebylo jasné, o jakou látku se přesně jedná, nebylo snadné tuto kontaminaci, která způsobovala buď nespecifické vyvázení terbia, nebo zákal vzniklý v kyvetě, popřípadě oboje, odstranit. Použití chitinas na odbourání chitinu z kolony nebo přídavné pročištění na jiných kolonách, s použitím reversibilní denaturace proteinu vysokou koncentrací močoviny, nedovolovaly zachovat stav, aktivitu a čistotu proteinu vhodné pro vazebné pokusy s terbiem. Stále zde musela být zachována podmínka nepřítomnosti kovových iontů v prostředí, aby byl FrpC Δ RTX protein zachován v nenaštěpené formě.

Jednou z možností odstranění této neznámé kontaminace bylo přídavné pročištění vzorku na koloně se Sephadexem G-25, který by však nesměl být ekvilibrován kolonovým pufrům s EDTA (přítomnost EDTA ve vzorku proteinu ve všech izolačních krocích je nezbytná, aby chelatovala volné vápenaté ionty a protein zůstal v nenaštěpené podobě).

Byla zde také možnost, že kontaminace pochází z chitinu nebo Sephadexu G-25, které byly použity při každé izolaci proteinu. V následujících pokusech byly kolony ekvilibrovány pufrů s EDTA a bez EDTA a byl zde zkoušen průchod vzorku proteinu kolonou a prázdného vzorku bez proteinu (pufr). Při těchto pokusech byly jímány všechny frakce (po 0,5 ml), u kterých byla následně analysována schopnost vázat terbium (vzrůstem emise terbia) a

přítomnost proteinové složky (tedy přítomnost aminokyseliny tryptofanu obsažené v proteinu) projevující se emisí na $\lambda = 340$ nm při excitaci na $\lambda = 295$ nm. Při použití pufru bez EDTA (TN pufr) k ekvilibraci kolony složka vázající terbium koreluje s přítomností proteinové složky. Byl-li k ekvilibraci kolony použit pufr s EDTA (TNE pufr, EDTA 1 mM), složka vázající terbium byla přítomna ve všech frakcích včetně „mrtvého objemu“ kolony (kdy kolonou ještě neprotekl vzorek a z kolony vytéká její původní obsah, tedy ekvilibrační pufr) bez zjevné souvislosti s proteinovou frakcí (obr. 12).



Obr. 12: Graf zobrazuje přítomnost proteinu (jako koncentraci Trp) a neznámých látek vázajících terbium v jednotlivých frakcích po eluci vzorků FrpC Δ RTX proteinu purifikovaného afinitní chromatografií na chitinu pomocí systému založeném na inteinu z kolony se Sephadexem G-25: modré pole znázorňuje průtok proteinové složky (3,5.-6,5. ml, emise tryptofanu na $\lambda = 340$ nm při excitaci $\lambda = 295$ nm). Další dvě závislosti v grafu znázorňují emisi terbia na $\lambda = 545$ nm (při přímé excitaci $\lambda = 240$ nm), která je odpovídajícím způsobem zesílena vazbou na neznámou látku eluovanou z kolony a vázající terbium. První frakce (2,5 ml) odpovídá „mrtvému objemu“ kolony. Při použití TN pufru (pufr bez EDTA, „TN pufr“) pro ekvilibraci kolony koreluje přítomnost proteinu s vazbou terbia, zvýšení vazby terbia od šestého mililitru lze přisuzovat kontaminující látce, která je na koloně oproti proteinu zpožděna. Při použití TNE pufru (pufr s EDTA, „TNE pufr“) je látka vázající terbium přítomná již v první frakci, protože je uvolňována již při ekvilibraci kolony.

Při použití ekvilibračního kolonového TN pufru s obsahem EDTA pro chitinové a sephadexové kolony jsou tedy pomocí EDTA zřejmě chelatovány veškeré kovové ionty, včetně iontů vápenatých, které mají patrně stabilizující účinek na strukturu dextranů v koloně. Odstraněním těchto iontů může pravděpodobně dojít k uvolňování malých fragmentů dextranů do jímaných frakcí v celém objemu pufru při průtoku kolonou.

Pro odstranění předpokládané kontaminace byl zařazen konečný purifikační krok proteinů určených pro vazebné pokusy s terbiem – precipitace proteinu síranem amonným (vysolení, viz 3.2.12).

Do jaké míry bylo či nebylo dále terbium vázáno na samotný protein není snadné posoudit, protože není možné připravit zcela relevantní kontrolu, blank/slepý vzorek bez proteinu. Není možné posoudit, jaká část fosforescence je dána emisí terbia na proteinu (frakce terbia na proteinu a mimo protein mají rozdílné kvantové výtěžky – ačkoliv je terbium zhaseno molekulami vody, je schopné emise i bez navázání na jinou molekulu, která by tyto molekuly vody odstranila). Nebyl zde možný standardní postup: excitovat terbium vázané na FrpC Δ RTX proteinu pomocí rezonančního přenosu energie z přilehlé aminokyseliny (excitace $\lambda = 295$ nm fluoroforů Trp, Tyr, Phe), kdy by bylo možné odvodit vazebné hodnoty přímo pro vápenaté ionty (jak bylo použito v práci BASU *et al.*, 2003). Tyto aminokyseliny se nenacházejí v blízkosti vázaného terbia v konformaci proteinu odpovídající prostředí bez iontů, což vyplynulo z pokusů. Toto by byl účinnější způsob excitace terbia oproti přímé excitaci na $\lambda = 240$ nm, která byla použita v této práci. Rozdíl v emisi vázaného terbia oproti nevázanému by v takovém případě byl větší.

Další problém představuje skutečnost, že závislost intensity fosforescence terbia na koncentraci terbia v pufru nemá lineární průběh (MILLER *et al.*, 1986) mimo jiné proto, že pufrы jako Tris nebo MES chelatují terbité ionty (CALDWELL 1989) se zhasením jako možným důsledkem podobně jako EDTA, která terbium chelatuje, ale jeho emisi neovlivňuje (MA *et al.*, 1993). EDTA byla, byť v nízké koncentraci, nutně ve vzorku proteinu přítomna, protože izolace a purifikace FrpC Δ RTX proteinu probíhá za přítomnosti EDTA, aby nedocházelo k samovolnému autokatalytickému štěpení FrpC Δ RTX proteinu vlivem přítomnosti vápenatých iontů.

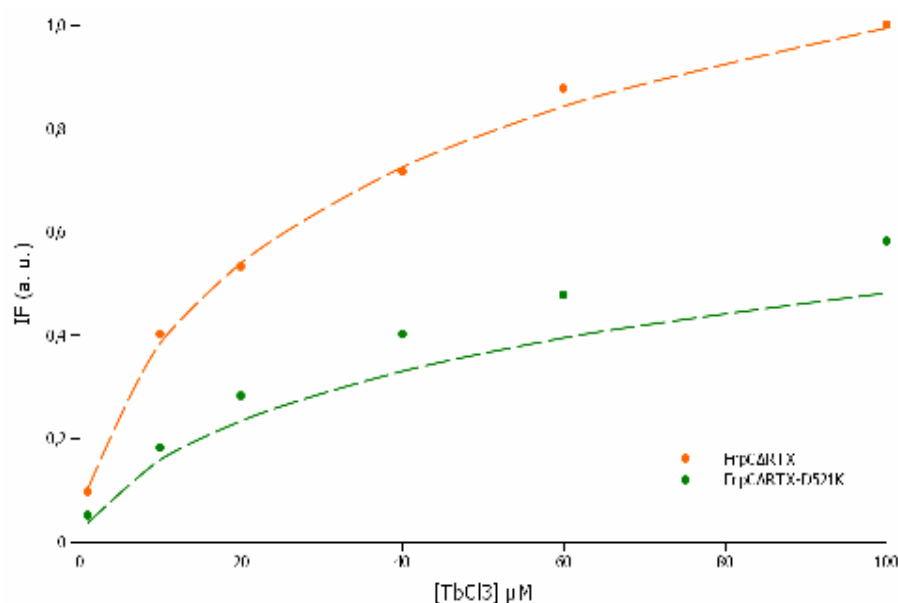
4.3.2 Odstranění zákalu vzniklého při vyšších koncentracích terbia (od koncentrace 100 μM Tb^{3+})

Podle informací převzatých z literatury (MILLER *et al.*, 1986) byl zákal způsoben interakcí pufru a terbia při pH 7,4. Tento zákal navíc vzniká ve větší míře a rychleji, je-li vzorek osvětlen bílým světlem, jak bylo zjištěno při pokusech o osvětlení původu zákalu. Pro odstranění tohoto artefaktu byly změněny podmínky vazebných pokusů s terbiem: bylo sníženo pH z pH 7,4 na pH 6,0. Zároveň byl použit jiný pufr kvůli pufrační kapacitě v daném pH, dále byl používán MES pufr namísto TN pufru (Tris). V těchto podmínkách se zákal netvořil. Tyto podmínky by neměly ovlivnit vazbu terbia na protein, protože Frp Δ RTX protein je v pH 6,0 stále schopen vykonávat svou enzymatickou aktivitu (OSICKA *et al.*, 2004).

4.3.3 Zpracování dat z titrace Frp Δ RTX proteinů terbiem

K proteinům Frp Δ RTX a Frp Δ RTX-D521K o koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$ v MES pufru o pH 6,0 bylo přidáván roztok chloridu terbitého tak, aby výsledná koncentrace terbia nabývala požadovaných hodnot (1-200 μM). Data získaná z tohoto pokusu, tedy závislost intenzity fosforescence terbia jako funkce koncentrace terbia, byla podrobena analýze proložením Hillovy funkce v programu QtiPlot (OS Linux). Tento program umožňuje regresi experimentálních dat Hillovou funkcí (3.2.17.2.1) a odečíst parametry Hillovy funkce: k_D (disociační konstanta) a n (Hillův koeficient, míra kooperativity vazby).

Po odstranění kontaminující látky přítomné ve vzorku proteinů, která vyvazovala terbium, se podařilo získat potřebné množství dat k odvození těchto parametrů pro Frp Δ RTX a mutovanou variantu s mutací omezující autokatalytické štěpení Frp Δ RTX-D521K. U této mutanty je mutací odstraněno předpokládané místo vazby vápenatých iontů, které jsou pro autokatalytické štěpení požadovány. Z obr. 13 je patrné, že mezi oběma variantami proteinu je rozdíl v hodnotách disociační konstanty pro terbium.



Obr. 13: Titrace terbiu vázajících míst proteinů FrpCΔRTX a FrpCΔRTX-D521K terbiem: graf ukazuje intenzity fosforescence terbia jako funkci jeho koncentrace. Koncentrace FrpCΔRTX proteinu 5 μg/ml. Přerušované čáry znázorňují křivky vypočtené z Hillovy funkce za použití parametrů vycházejících z naměřených hodnot pro příslušné křivky.

Na základě dat z obr. 13 byly uvedeným způsobem spočítány tyto hodnoty:

FrpCΔRTX	$k_D = 76 \mu\text{M}$	$n = 0,65$
FrpCΔRTX-D521K	$k_D = 111 \mu\text{M}$	$n = 0,69$

Vyšší hodnota disociační konstanty u mutantní varianty, FrpCΔRTX-D521K oproti nemutované variantě FrpCΔRTX značí, že u FrpCΔRTX-D521K jsou jeho vazebná místa jsou schopná navázat terbiu až při vyšší koncentraci oproti FrpCΔRTX. Hillův koeficient, míra kooperativity vazby terbia na protein, je přes nepatrné rozdíly stejný a v obou případech odpovídá negativní kooperativě – je-li terbiu již jednou v daném místě navázáno, je afinita jiných iontů terbia k tomuto místu snížena.

Z výsledků titrací FrpCΔRTX proteinů terbiem bohužel nelze posoudit, zda se na těchto proteinech nachází více vazebných míst pro terbité ionty. Nelze tedy ani posoudit, zda mají tato místa stejné nebo rozdílné disociační konstanty. Samotná Hillova funkce nepostačuje ke komplexnímu popisu těchto vazebných míst. Osička (OSICKA *et al.*, 2004) předpokládá přítomnost čtyř až pěti vazebných míst pro vápenaté ionty na FrpC proteinu vně RTX domény.

Tato předpokládaná místa pro vápenaté ionty mají zřejmě různé disociační konstanty a tedy i rozdílnou afinitu k vápenatým iontům (OSIČKA, osobní sdělení) a mají zajišťovat proteinu konkrétní konformaci danou přítomností vápníku v různých prostředích (uvnitř a vně buňky). Jednotnost kvantity emise navázaných terbitých iontů do různých vazebných míst pro terbium je velice nejednoznačná. Jednotlivá vazebná místa mohou poskytovat různou kvalitu odstínění molekul vody od terbitých iontů, jejichž emise pak závisí právě na zhášení vodou.

Z těchto důvodů je nutné brát naměřené hodnoty disociačních konstant spíše jako orientační. Jelikož FrpC Δ RTX proteiny navázáním terbia mění nejen svou konformaci, ale dochází zde i ke změně velikosti proteinu dané štěpením, mohou zde s určitou dynamikou v různém čase vznikat či zanikat potenciální jiná vazebná místa pro terbium (a vápník), která mohou být zavádějící ze strany výsledků. Bylo také neskonné naměřit stejné hodnoty s různě „starým“ vzorkem proteinu, protože FrpC Δ RTX každým rozmražením a jakoukoliv manipulací mění poměr nenaštěpené varianty směrem k naštěpené, nejspíš degradované formě. Jakýkoliv fragment FrpC Δ RTX proteinu, který obsahuje vazebné místo pro iont a není přímo denaturován, může být schopen iont navázat, ale s různými důsledky pro celkový konečný výsledek.

Tyto vazebné pokusy s terbiem ukázaly rozdíl v disociačních konstantách mezi oběma variantami proteinu, z kterých je možné usuzovat, že substituce lysinu za aspartát na pozici 521. aminokyseliny ve FrpC Δ RTX proteinu v potenciální „EF-hand“ struktuře určené k vazbě vápenatých iontů, pozměnila skutečné vazebné místo pro terbitý iont, a že toto domnělé vazebné místo pro vápník je místem reálným.

4.4 Titrace komplexů FrpC Δ RTX-Tb³⁺ a FrpC Δ RTX-D521K-Tb³⁺ vápníkem

Odstranění terbitých iontů navázaných na proteiny pomocí titrace vápenatými ionty bylo použito z několika důvodů: 1) pro ověření totožnosti vazebných míst na proteinech pro terbium a pro vápník a 2) pro srovnání

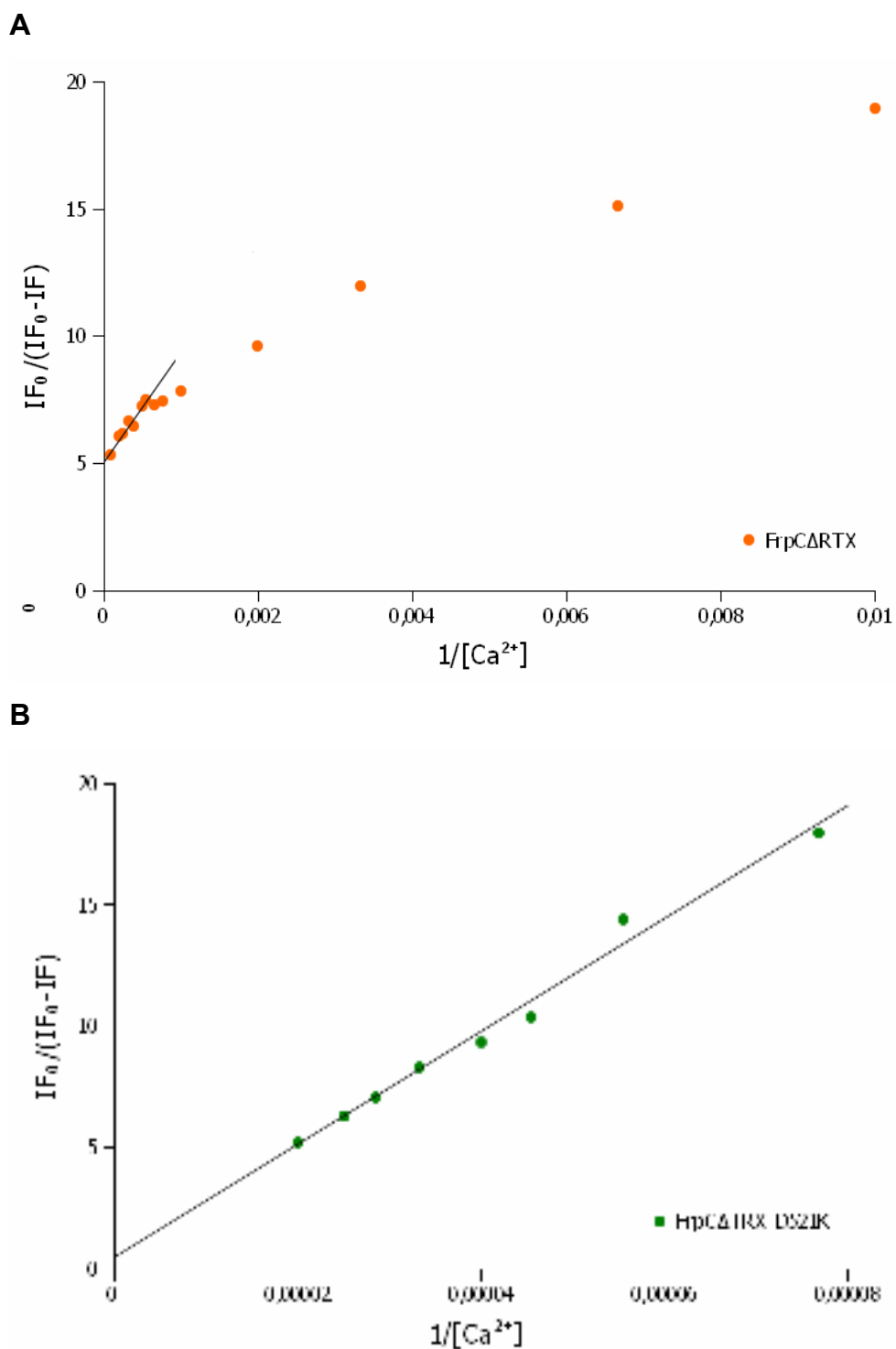
rozdílu mezi vazbou terbia a vápníku na obou proteinech, odlišnosti dynamiky vytěsnění iontů terbitých vápenatými, pro srovnání významu předpokládaného vápník vazebného místa v mutantním FrpC Δ RTX-D521K proteinu oproti nemutované variantě FrpC Δ RTX.

Při tomto pokusu bylo k FrpC Δ RTX a FrpC Δ RTX-D521K (oba o koncentraci 2 μ g/ml) s navázanými ionty terbia (o koncentraci 200 μ M) přidáván roztok CaCl₂, jak je detailně popsáno v 3.2.17.3.

Při titraci komplexů FrpC Δ RTX-Tb³⁺ a FrpC Δ RTX-D521K-Tb³⁺ ionty vápníku bylo možné navázané terbité ionty odstranit ze stávajících vazebných míst ionty vápenatými. Výsledky těchto pokusů byly vyneseny do grafu podle s modifikované Stern-Volmerovy rovnice (viz 3.2.17.3.1) používané pro vyhodnocování zhášení fluorescence.

4.4.1 Modifikované Stern-Volmerovo vynesení

Modifikované Stern-Volmerovo vynesení je odvozeno z modifikované Stern-Volmerovy rovnice (rovnice 2, 3.2.17.3.1). Podíl počáteční intenzity fosforescence a rozdílu počáteční a okamžité intenzity fosforescence ($\frac{IF_0}{(IF_0 - IF)}$) je zde vynášen oproti převrácené hodnotě koncentrace vápníku ($\frac{1}{[Ca^{2+}]}$). Průnik této funkce s osou y je roven převrácené hodnotě frakce terbia dostupné pro vytěsnění ionty vápníku. Vyhodnocením výsledků z modifikovaného Stern-Volmerova vynesení je odečet místa průniku funkce s osou y (obr. 14 A a B).



Obr. 14 A a B: Modifikované Stern-Volmerovo vynesení dat z vytěšňování terbitých iontů z jejich vazebných míst na FrpC Δ RTX (A) a FrpC Δ RTX-D521K (B) proteinech ionty vápníku. Koncentrace FrpC Δ RTX a FrpC Δ RTX-D521K proteinů byla 2 μ g/ml, koncentrace TbCl₃ 200 μ M. Pro FrpC Δ RTX-Tb³⁺ bylo použito CaCl₂ ve výsledných koncentracích od 10 μ M do 10 mM, pro FrpC Δ RTX-D521K-Tb³⁺ bylo použito CaCl₂ ve výsledných koncentracích od 13 mM do 50 mM.

Ačkoliv rozsah použitých koncentrací CaCl_2 pro oba proteiny není stejný, výsledky ukazují na rozdíly mezi oběma proteiny. U FrpC Δ RTX proteinu protíná funkce osu y v hodnotě 5 (obr. 14 A) – pouze 20 % terbitých iontů bylo dostupných a bylo je možno odstranit titrací vápenatými ionty. Oproti tomu u FrpC Δ RTX-D521K v rozsahu hodnot koncentrace vápenatých iontů použitých pro FrpC Δ RTX (10 μM -10 mM) k žádnému odstranění terbia nedošlo. Při zvýšení koncentrace vápníku až do 50 mM bylo možné odstranit veškeré terbium, funkce protíná osu y přibližně v hodnotě 1 (obr. 14 B). FrpC Δ RTX protein vazbou iontů terbia patrně nabývá zcela jiné konformace než jeho mutantní varianta FrpC Δ RTX-D521K. Navázáním iontu terbia do vazebného místa na pozici 521. aminokyseliny, která je v mutantním proteinu pozměněna, je ovlivněna terciární struktura proteinu. Nemutovaný, wild-type, FrpC Δ RTX protein nabývá po konformační změně dané navázáním iontu terbia kompaktnější struktury. Navázané ionty terbia jsou pak pro nahrazení ionty vápníku méně dostupnými a nelze je vlivem vápníku odstranit. Tato „kompaktní“ konformace se zřejmě neobjevuje u mutantní varianty FrpC Δ RTX-D521K, která si po vazbě terbia uchovává rozvolněnou konformaci přístupnou pro vápenaté ionty.

Koncentrace CaCl_2 při titraci komplexů protein-terbium (pro FrpC Δ RTX-Tb³⁺ bylo použito CaCl_2 ve výsledných koncentracích od 10 μM do 10 mM, pro FrpC Δ RTX-D521K-Tb³⁺ bylo použito CaCl_2 ve výsledných koncentracích od 13 mM do 50 mM) byly zvoleny pro zobrazení konečných výsledků. Tyto koncentrace odpovídají koncentracím vápenatých iontů, při kterých bylo možné vytěsnit terbité ionty, a vycházelo se ze znalosti chování obou proteinů v širší škále koncentrací CaCl_2 . Vzorek pro konečné výsledky měl být co nejméně ředěn mnoha přídatky CaCl_2 , aby odchylka od skutečných hodnot intensity (intensity korigovaná vzhledem k naředění) byla co nejmenší a mohla být zanedbána. U kontrolních vzorků pro ředění terbia pufrém (komplexe protein-terbium s přídatky pufru o objemech odpovídajících objemům CaCl_2 při vytěšňování terbia z vazebných míst pro terbium na FrpC Δ RTX proteinech) a pokusném zhášení terbia vápníkem (vzorek terbia 2 mM s přídatky CaCl_2 o objemech a koncentracích odpovídajících skutečnému pokusu) bylo snížení

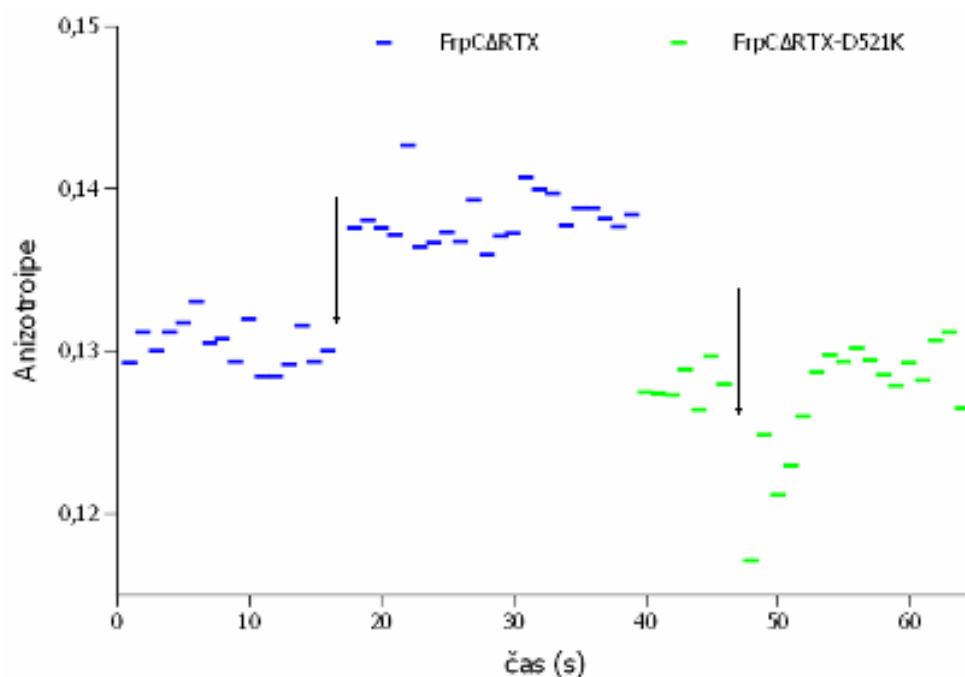
terbiové emise zanedbatelné. Mimo to, celková změna objemu vzorku způsobující naředění vzorků v těchto pokusech činilo zhruba 5 %.

4.5 Měření anizotropie fluorescence tryptofanu FrpC Δ RTX proteinu

Tento experiment byl proveden proto, aby mohla být popsána změna konformace těchto proteinů způsobená přítomností vápenatých iontů v prostředí, dále pak porovnat tuto změnu u proteinů FrpC Δ RTX a FrpC Δ RTX-D521K. Při tomto experimentu byla měřena anizotropie fluorescence tryptofanu ve FrpC Δ RTX proteinu v přítomnosti a nepřítomnosti 200 μ M CaCl₂, tryptofan byl excitován UV zářením o vlnové délce $\lambda = 295$ nm a emise byla sledována o vlnové délce $\lambda = 340$ nm. Proteiny FrpC Δ RTX a FrpC Δ RTX-D521K o koncentraci 3 μ g/ml byly v 2 ml MES pufru o pH 6,0 při teplotě 24 °C.

Tímto experimentem bylo tedy možné porovnat význam předpokládaného místa vázajícího vápník (pozice 521 na FrpC Δ RTX proteinu) pro konformační změnu proteinu vlivem navázání vápníku. Proteiny pro tento pokus byly precipitovány síranem amonným (3.2.12), aby bylo možné sledovat změnu anizotropie při koncentraci CaCl₂ co možná nejbližší předpokládané afinitě vápenatých iontů k vazebným místům na proteinech. Kontaminace vzorků proteinu popsaná dříve (fragmenty chitinu a Sephadexu G-25 z kolon pro purifikaci proteinů, 4.3.1) by mohla zkreslit výsledky za předpokladu, že tato kontaminující látka bude schopná vázat i vápník. U obou proteinů bylo SDS-PAGE (3.2.14) elektroforesou ověřeno, že použité proteiny nebyly naštěpeny vlivem precipitace síranem amonným.

Obr. 15 zobrazuje průběh měření anizotropie fluorescence tryptofanu bez přidaného CaCl₂ a po přidání 200 μ M CaCl₂ jako časovou závislost anizotropie. Přírůstek anizotropie se po přidání 200 μ M CaCl₂ u FrpC Δ RTX byl +0,008. Taková změna anizotropie odpovídá přechodu ze stavu více relaxovaného k rigidnějšímu. Celková změna anizotropie po přidání 200 μ M CaCl₂ u FrpC Δ RTX-D521K byla řádově menší (-0,0005) na hranici detekce.



Obr. 15: Měření anizotropie fluorescence tryptofanů přítomných ve FrpC Δ RTX proteinech: změny anizotropie fluorescence tryptofanů ve FrpC Δ RTX a FrpC Δ RTX-D521K proteinech sledované v čase. Černé šipky značí okamžik přidavku 200 μ M CaCl₂. Koncentrace FrpC Δ RTX a FrpC Δ RTX-D521K proteinů byla 2 μ g/ml, finální koncentrace přidaného CaCl₂ byla 200 μ M.

Přídavek 200 μ M CaCl₂ tedy nemá stejný vliv na oba proteiny. Konformace nemutovaného proteinu FrpC Δ RTX podléhá změně vlivem přítomnosti vápenatých iontů více než konformace proteinu FrpC Δ RTX-D521K s vnesenou mutací v domnělém místě vazby vápníku. Pro nemutovaný, wild-type, protein tedy patrně přítomnost vápníku už v této koncentraci znamená změnu konformace – rigidizaci struktury. Tato změna by mohla hrát roli ve funkci proteinu v jeho přirozeném prostředí, protože mimo buňku je této koncentrace CaCl₂ dosaženo. Vazba vápenatých iontů na FrpC Δ RTX proteinu v blízkosti 521. aminokyseliny má pravděpodobně význam na změnu konformace proteinu a podílí se na rigidizaci struktury FrpC Δ RTX proteinu. Odlišná změna konformace mutované varianty proteinu podporuje dříve popsané výsledky vystihující význam tohoto vazebného místa pro vápenaté ionty (OSICKA *et al.*, 2004).

Při precipitaci proteinu síranem amonným dala asi jen polovina provedení správný výsledek a proteiny nebyly naštěpeny či denaturovány.

Proto nebylo k dispozici dostatečné množství materiálu na důkladnější prověření změny konformace proteinu, nemohla být sledována případné změny konformace FrpC Δ RTX proteinu při nižších koncentracích vápenatých iontů, popřípadě změny konformace FrpC Δ RTX-D521K proteinu ve vyšších koncentracích vápenatých iontů.

4.6 Perrinovo vynesení

Tento experiment byl proveden na základě poznatků Ing. Pavla Macka (Laboratoř molekulární biologie bakteriálních patogenů, MBÚ AV, ČR), který provádí NMR studie s částí FrpC proteinu, tzv. SPM, self-processing modul). Jeho výsledky (MACEK, osobní sdělení) ukazují, že tato část FrpC proteinu je schopná zaujmout definovanou konformaci pouze za přítomnosti vápenatých iontů. SPM bez přítomnosti vápenatých iontů zůstával v rozvolněném stavu.

Následující experimentální přístup měl umožnit prošetřit fluorescenční metodou vliv vápenatých iontů na konformaci FrpC Δ RTX proteinu v prostředí s vápníkem a bez vápníku. Porovnáním shora uvedené NMR studie a fluorescenční studie v této práci by bylo možné vyvozovat další důsledky o vazebných místech pro vápník na FrpC proteinu mimo RTX doménu, tedy vliv vazby vápníku v určitém místě na zaujetí funkční konformace proteinu.

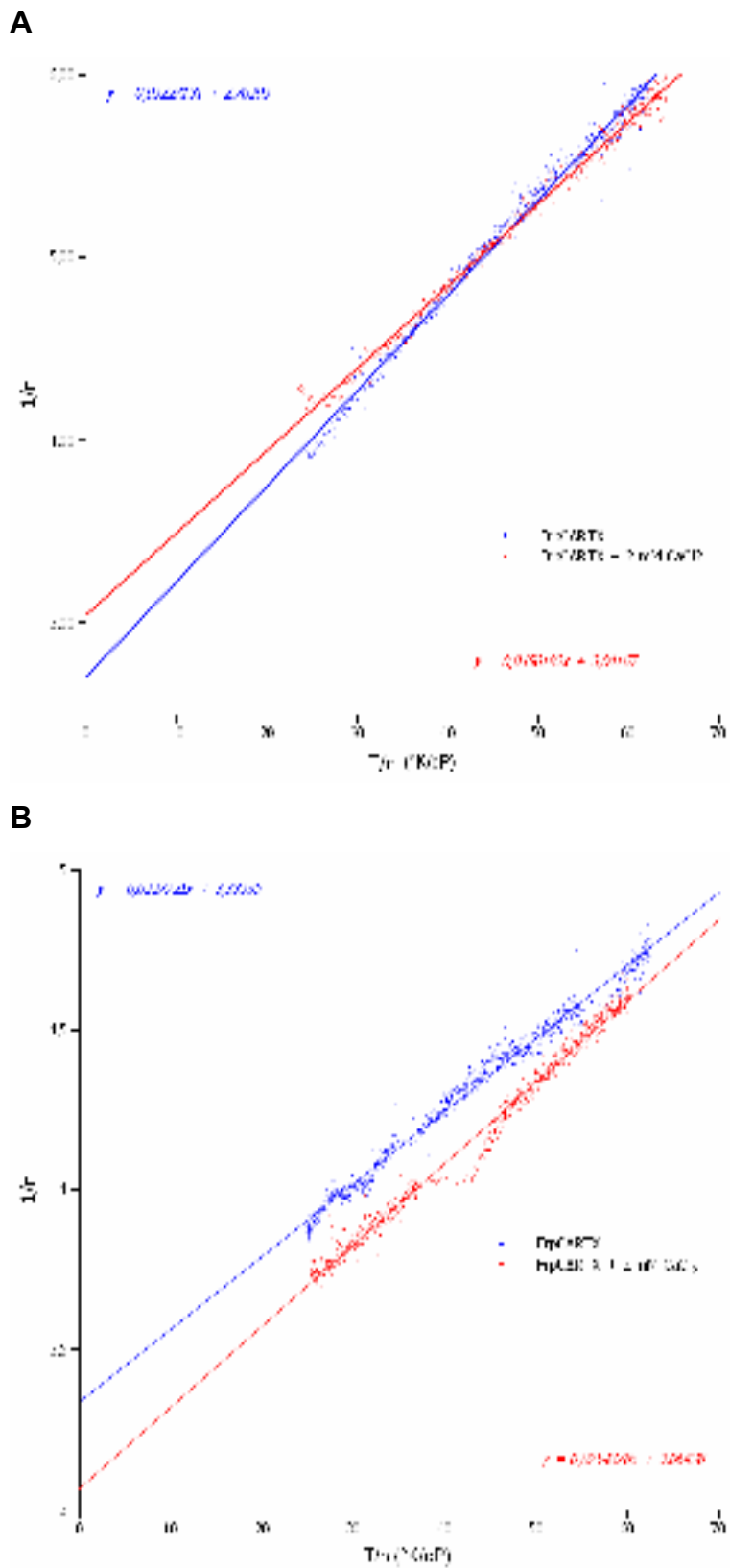
Perrinovy rovnice (3.2.19) je možné použít pro výpočet velikosti molekuly-proteinu. Předpokládáme-li, že protein má kulový tvar, rychlost jeho rotace je nepřímo úměrná (popř. rotační korelační čas je přímo úměrný) jeho molekulové hmotnosti. Předpokladem pro provedení tohoto experimentu byla znalost doby života excitovaného stavu fluoroforu, se kterým je protein asociován. FrpC Δ RTX protein byl značen fluorescenční sondou ANS (1-anilinonaphtalene-6-sulphonate), která se váže nekovalentně do nepolárních oblastí proteinu. Pro Perrinovo vynesení byla měřena anizotropie fluorescence fluorescenční sondy ANS na proteinu v roztoku 50% glycerolu (v MES pufru) jako teplotní závislost při stoupající teplotě z 5 °C do 25 °C, kdy se zároveň měnila viskozita vzorku. Viskozita roztoku glycerolu byla zjištěna z tabulek (převzato z <http://www.dow.com/glycerine/resources/table18.htm>). Pro Perrinovo vynesení byly měřeny dva druhy vzorků: FrpC Δ RTX protein bez

2 mM CaCl₂ reprezentující vzorek proteinu bez ligandu a FrpCΔRTX v přítomnosti 2 mM CaCl₂ reprezentující vzorek proteinu se svým ligandem.

Ve výsledném grafu je vynesena převrácená hodnota naměřené anizotropie fluorescence sondy ANS ($\frac{1}{r}$) jako funkce podílu teploty a viskozity ($\frac{T}{\eta}$) vyjádřené v jednotkách (°K/cP).

Výsledkem Perrinova vynesení by měla být závislost, ve které převrácená hodnota anizotropie fluorescence klesá s klesajícím podílem teploty a viskozity tak, že obě závislosti – znázornění proteinu s ligandem a bez ligandu – se mají navzájem protnout na ose y v hodnotě limitní anizotropie r_0 , která odpovídá prostředí o nekonečné viskozitě (LAKOWICZ 2006).

Výsledky tohoto pokusu na obr. 16 A a B ukazují, že výsledky neodpovídají předpokladům Perrinova vynesení. Obě závislosti odpovídající proteinu s ligandem a proteinu bez ligandu se nespojují v bodě společné limitní anizotropie, ani do něj nesměřují. Výsledky několika na sobě nezávislých provedení byly natolik různé, že bylo nutno tento typ měření v tomto provedení prohlásit za nereprodukovatelný z neznámých důvodů. Hodnota limitní anizotropie r_0 odráží pouze vlastnosti fluorescenční sondy asociované s proteinem (nezávisle na vazbě s proteinem), a proto by měla vždy končit v jednom bodě. Průběh závislosti anizotropie na teplotě a/nebo viskozitě je dán navázáním sondy na protein, které ovlivňuje rotaci sondy. Perrinův výnos pro samotnou fluorescenční sondu ANS by při stejných podmínkách tohoto pokusu měl končit v téže hodnotě limitní anizotropie, lišila by se pouze celková změna anizotropie, protože samotná sonda by v roztoku rotovala nejrychleji. Vyjdeme-li z předpokladu, že protein v přítomnosti vápníku zaujme kompaktnější konformaci v prostoru (na rozdíl od rozvolněné struktury proteinu bez vápníku), jak tomu nasvědčují výsledky měření anizotropie tryptofanu FrpCΔRTX proteinu (kap. 4.5), měla by navázaná sonda za vyšší teploty rotovat rychleji než protein bez vápníku, jehož struktura je rozvolněná. Změna anizotropie fluorescence měřená na takové struktuře (FrpCΔRTX v přítomnosti vápenatých iontů) by měla být větší oproti struktuře relaxované (FrpCΔRTX bez vápenatých iontů) a přímka, která by byla touto funkcí proložena, by v případě proteinu s vápníkem měla mít strmější průběh.



Obr. 16 A a B: Perrinův výnos pro Frp Δ RTX v nepřítomnosti ligandu, 2 mM CaCl₂ (modrá) a pro Frp Δ RTX v přítomnosti ligandu, 2 mM CaCl₂ (červená). Obě funkce nesměřují do společného bodu základní anizotropie (v blízkosti osy y). Tento Perrinův výnos tedy nelze použít pro výpočet objemu Frp Δ RTX proteinu.

Bohužel není dostatečně jasné, co vedlo k těmto špatně reprodukovatelným výsledkům. Na vině mohou být špatné uspořádání experimentu (problém byl například s mícháním roztoku glycerolu v nižších teplotách).

4.7 *Ab Initio* predikce struktury proteinů (3D modelování) pomocí programu Rosetta++ 2.3.0

Predikce struktury vazebného místa pro vápenaté ionty FrpC proteinu *Neisseria meningitidis*, které leží v místě předpokládané EF-hand struktury v okolí pozice 521 FrpC proteinu, byla prováděna proto, aby mohlo být pomocí *in silico* metody zobrazeno vazebné místo pro vápenaté ionty a vliv mutace D521K na strukturu tohoto vazebného místa a samotnou vazbu vápenatých iontů.

První volbou sekvence pro modelování vazebného místa pro vápník byla 29aminokyselinová sekvence zahrnující pouze oblast domnělé EF-hand struktury (512. až 541. aminokyselina FrpC proteinu). Po vyhodnocení první části modelování bylo patrné, že peptid tvořený pouze 29 aminokyselinami byl příliš krátký a výsledné vygenerované struktury měly tendenci zaujímat v prostoru strukturu s co nejnižší energií, tedy strukturu co možná nejvíce odpovídající kuličce. Místo domnělé vazby vápenatých iontů bylo tedy deformováno na úkor celkové prostorové konformace peptidu vzhledem k okolí. Proto byl tento experiment přerušen a byla zvolena delší sekvence 50 aminokyselin od 502. aminokyseliny po 551. aminokyselinu (viz kap. 3.2.21).

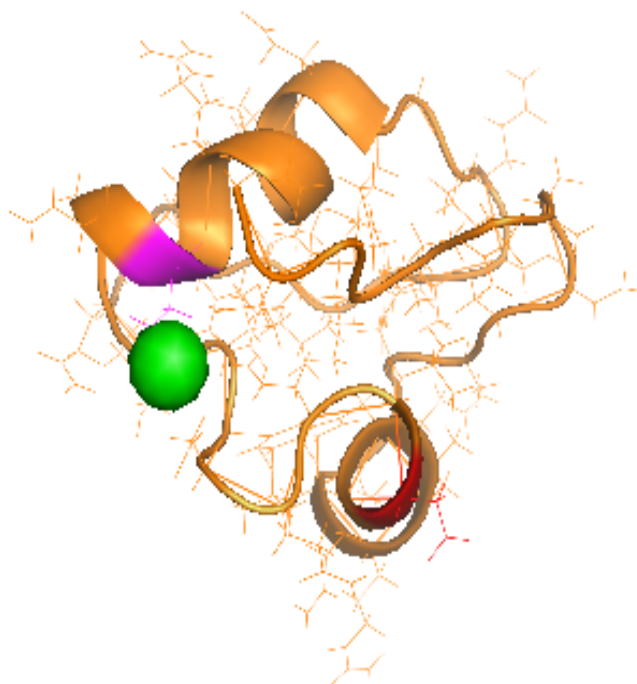
Struktury, které z tohoto experimentu s 50 aminokyselinovou sekvencí byly na základě ligandového skóre vybrány jako vítězné (viz obr. 17 A, B a C), veskrze neodpovídají předpokladu o struktuře vázající vápenaté ionty EF-hand. Prvním důvodem je prostorové rozložení postranních řetězců aminokyselinových zbytků, které jsou popsány jako činné ve vazbě vápenatého iontu. Například první aminokyselina smyčky EF-hand struktury (pozice 521 FrpC proteinu), jejíž mutace snižuje aktivitu autokatalytického štěpení FrpC proteinu, jejímž výsledkem je také nižší vazba vápenatých iontů, která má být jedním z prvků, který tvoří pentagonální bipyramidu vázající vápenatý iont,

nemá ve většině případů vítězných struktur (i struktur s nižším ligandovým skóre) svůj postranní řetězec namířen směrem k předpokládanému místu vazby vápníku. Druhým důvodem je fakt, že naprostá většina vápenatých iontů, které byly vázány preferenčně k této výše zmíněné aminokyselině s velkou prostorovou tolerancí (3 nm), byla navázána co možná nejdále od této aminokyseliny mimo dosah případné vazby postranním řetězcem této aminokyseliny.

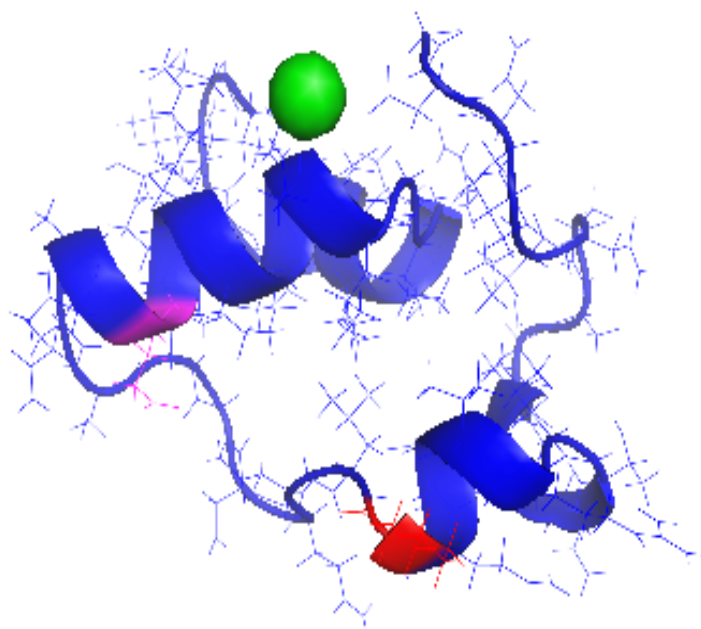
Vazebné místo vápenatého iontu na tomto fragmentu FrpC proteinu může mít skutečně strukturu odlišnou od struktury klasického EF-handu. Skutečnost, že se vápenatý iont váže na jiné místo, nikoliv do EF-hand struktury vázající běžně vápenatý iont, může znamenat, že iont je v této modelované struktuře takto navázán. Rosetta našla stabilní peptidovou strukturu schopnou dobře vázat vápník. Taková struktura ovšem vůbec nemusí odpovídat reálnému místu pro vazbu vápníku ve FrpC proteinu. Toto místo, bylo-li Rosettou modelováno a nalezeno tak, jak skutečně ve FrpC proteinu existuje, nemusí být hodnoceno jako dobrý vazač vápníku. Rosetta navíc nedovoluje v procesu vázání vápníku konformační změny v rozsahu, ve kterém je FrpC protein po navázání vápenatých iontů může prodělavat.

Do budoucna zvažujeme podrobit nalezené 50aminokyselinové peptidy výpočtu molekulární dynamiky, tedy simulaci sbalování peptidu v přítomnosti molekul vody, sodných a vápenatých iontů. Takováto simulace odpovídá desítkám ns pohybu peptidu a mohla by umožnit nalezení reálnější konformace a nativní navázání vápenatých iontů. Tento výpočet však představuje stovky hodin procesorového času.

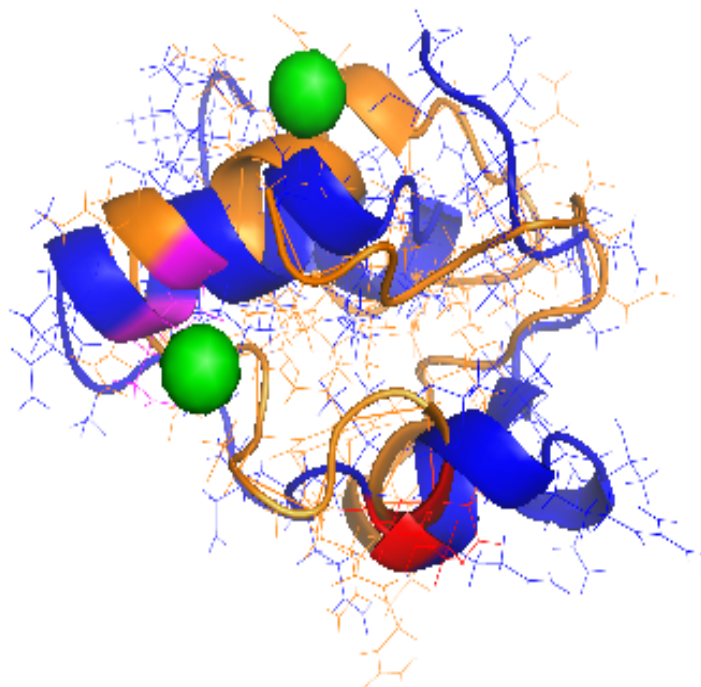
A



B



C



Obr. 17 A a B: Reprezentativní „vítězné“ struktury molekulárního 3D modelování (*Ab Initio* Rosetta++ 2.3.0). A – fragment FrpC_502-551 (oranžová), B – fragment FrpC-D521K_502-551 (modrá). Červeně je vyznačena pozice 521 FrpC proteinů, první aminokyselina smyčky EF-hand struktury (A - FrpC_502-551 - asparát, B – FrpC-D521K_502-551 – lysin). Růžově je vyznačena poslední aminokyselina smyčky EF-hand struktury, vždy glutamát. Zelená kulička je vápenatý iont.

Jedná se o konformace s nejpevnější nalezenou vazbou vápenatého iontu. Vápenatý iont zde není navázána v blízkosti pozice 521 FrpC proteinu, jak bylo předpokládáno, tato aminokyselina se nenachází v blízkosti vápenatého iontu a její postranní řetězec nemíří směrem k vápenatému iontu. Poslední aminokyselina smyčky předpokládané EF-hand struktury, která se má na vazbě vápenatého iontu také podílet, netvoří spolu s tímto asparátem strukturu popisovanou pro EF-hand strukturu (pentagonální bipyramida). Obr. C zobrazuje obě modelované struktury ve stejné poloze (alignment). Obě struktury mají velice podobnou polohu postranních řetězců činných předpověděné vazbě vápníku strukturou EF-hand, ačkoliv nejpevnější vazba vápníku se u každého z nich odehrává na odlišném místě.

4.8 Mikroskopické pozorování interakce FrpC proteinu s myšími makrofágy J774.A1

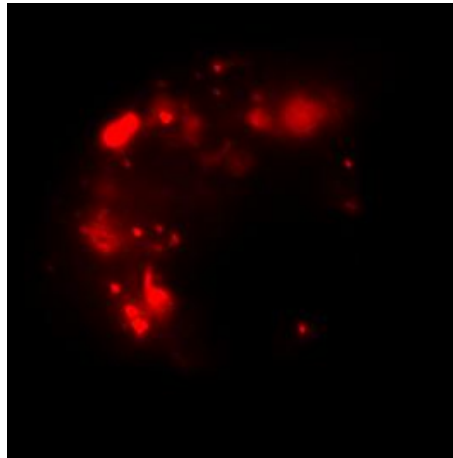
Tato práce navazuje na experimenty Dr. Ireny Linhartové, CSc., (Laboratoř molekulární biologie bakteriálních patogenů, MBÚ, AV ČR). Snahou jejích experimentů bylo objasnit neznámou biologickou funkci FrpC proteinu sledováním jeho interakcí s eukaryotními buňkami (A549, J774, aj.). Při této práci byl použit rekombinantní FrpC protein produkovaný v *E. coli*. Pro detekci FrpC proteinu s buňkami v konfokálním mikroskopu byl FrpC protein značen fluorescenčně značenou myší monoklonální protilátkou 9D4 proti repetitivním v RTX doméně. Pro mikroskopická sledování byly využity trvalé fixované preparáty (LINHARTOVÁ, osobní sdělení). Ačkoliv bylo v této práci vynaloženo obrovské úsilí o nalezení biologické funkce FrpC proteinu, práce nepřinesla jednoznačné výsledky. FrpC protein byl v těchto pokusech lokalizován na povrchu buněk v útvarech stále definované velikosti a cytotoxický efekt na buňky zde nebyl pozorován.

Důvodem pokusů prezentovaných v diplomové práci byla domněnka vycházející z výsledků Dr. Linhartové, kde FrpC protein zůstával na povrchu buněk, že FrpC protein nemusí při své biologické funkci do buněk vstupovat. Byla testována možnost, že funkcí FrpC proteinu by mohlo být blokování endocytických drah buněk napadených FrpC proteinem.

V této práci byl pro účel sledování interakce FrpC proteinu s eukaryotními buňkami použit rekombinantní FrpC protein produkovaný *E. coli* (kap. 3.1.8) izolovaný popsánymi postupy (pomocí afinitní chromatografie na chitinu pomocí systému založeném na inteinu, kap. 3.2.9, a gelovou permeační chromatografií na Sephadexu G-25, kap. 3.2.10), značený fluorescenční sondou Dyomics DY-647 (kap. 3.2.16). Příprava buněk myší makrofágové linie J774.A1 (kap. 3.1.9) pro sledování interakce s FrpC proteinem byly připravené a sledování probíhalo dle popisu (kap. 3.2.20.1-4).

Základní experiment – přímé sledování interakce samotného FrpC proteinu značeného fluorescenční sondou Dyomics DY-647 s živými buňkami myších makrofágů J774.A1 ve fluorescenčním mikroskopu Olympus Cell^R (objektiv 60x/1.35NA UplanSApo, olejová imerze) ukázal výsledky odlišné od

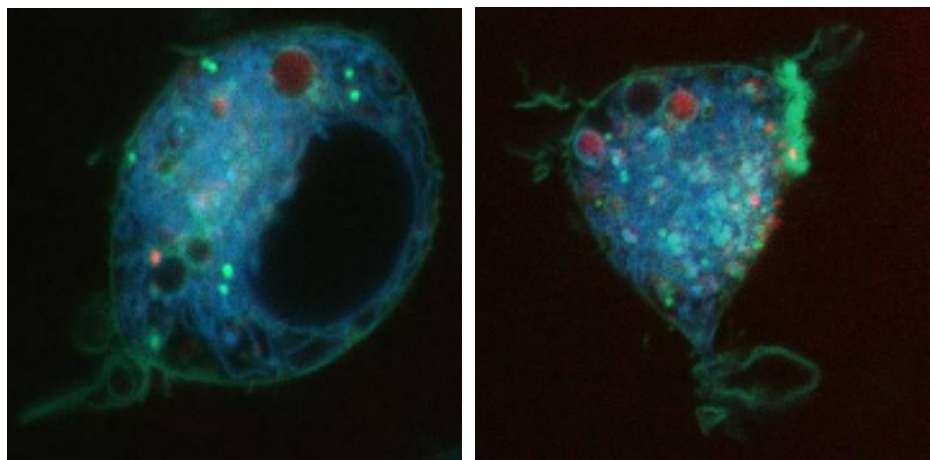
předpokladu, že FrpC protein zůstává na povrchu buněk. Na obr. 18 jsou buňky myších makrofágů J774.A1.



Obr. 18: Interakce FrpC proteinu značeného fluorescenční sondou DY-647 po inkubaci 15 minut. Koncentrace FrpC proteinu byla 1,5 $\mu\text{g/ml}$. FrpC protein (červený) se zdržuje v organizovaných útvarech asociovaných s buňkou. Mikroskop: Olympus Cell^R, objektiv 60x/1.35NA UplanSApo, olejová imerze, velikost snímku odpovídá 10x10 μm .

Následující experiment měl potvrdit, že FrpC protein byl po inkubaci s buňkou do buňky internalizován. Tento předpoklad mělo potvrdit následující sledování interakce FrpC proteinu s Myšími makrofágy J774.A1 (kap. 3.2.20.1-4) konfokálním mikroskopem Leica TCS SP2 (objektiv 63x/1.4NA, HCX PL APO, olejová imerze). Membrány makrofágů zde byly označeny fluorescenční sondou Laurdan (přidán k buňkám ve finální koncentraci 10 μM), aby bylo patrné případné umístění FrpC proteinu uvnitř buňky a jeho předpokládaná asociace s membránovými váčky. Molekula Laurdanu (2-dimethylamino-6-lauroylnaftalen) má hydrofobní část, díky níž se váže do membrány. Laurdan se používá např. pro sledování charakteru membrán, kde je schopen odlišit fáze tekutého krystalu a gelu (ZHANG *et al.*, 2006). Laurdan mění charakter své emise v závislosti na polaritě prostředí. Membrána ve fázi gelu je více uspořádaná na rozdíl od fáze tekutého krystalu. Ve fázi tekutého krystalu molekuly vody častěji vstupují do struktury membrány, což mění polaritu prostředí a charakter emise Laurdanu. Při excitaci Laurdanu vlnovou délkou $\lambda = 365 \text{ nm}$ emituje Laurdan v prostředí jehož polarita odpovídá fázi

gelu membrány s maximem o vlnové délce $\lambda = 435$ nm. V prostředí, jehož polarita odpovídá fázi tekutého krystalu, emituje Laurdan s červeným posunem (oproti méně polárnímu prostředí ve fázi gelu) s maximem o vlnové délce $\lambda = 490$ nm. Toho bylo využito pro detekci emise Laurdanu v membránách makrofágů, a barevného rozlišení rigidnější membrány od fluidnějších membrán buněčných organel. Laurdan byl snímán ve dvou kanálech, z nichž jeden odpovídal vlnovým délkám okolo maxima $\lambda = 365$ nm (rigidnější prostředí) a druhý vlnovým délkám okolo maxima $\lambda = 435$ nm (fluidnější prostředí). Na obr. 19 A a B jsou makrofágy, jejichž membrány a membránové struktury jsou vizualizovány pomocí fluorescenční sondy Laurdan (zelená, cytoplasmatická membrána, modrá, vnitřní membrány). Červeně označený je zde FrpC protein (Dyomics DY-647), který se jednoznačně nachází uvnitř buněk a v některých případech je jasně patrný uvnitř váčku, který je zformovaný vizualizovanou membránou.



Obr. 19 A a B: Myší makrofágy J774.A1 se značenou buněčnou (zelená) a cytoplasmatickou (modrá) membránou značené Laurdanem a FrpC protein (červená), který se nachází uvnitř buněk a v organelách se značenými membránami. Obrázky byly pořízeny na konfokálním mikroskopu Leica SP2 (objektiv 63x/1.4NA, HCX PL APO, olejová imerze) a zpracován pomocí software WCIF ImageJ.

Dále byla sledována internalizace FrpC proteinu kolkalizací FrpC proteinu s markery příslušné endocytické dráhy značenými fluorescenční

sondou. Použit byl BSA značený sondou Dyomics DY-547, který je markerem pro makropinocytosu, transferrin značený FITC, jako marker receptorem zprostředkované endocytosy závislé na clathrinu, a LysoTracker-red-DND-99, který je shromažďován pozdních endosomech a lysosomech. Tam, kde dochází ke korelaci výskytu FrpC proteinu s některým z markerů endocytických drah, se dá uvažovat o typu vstupu FrpC proteinu do buňky. Míra kolokalizace FrpC proteinu se zmíněnými markery byla hodnocena pomocí programu ImageJ. Prvním způsobem hodnocení kolokalizace FrpC proteinu s některým z markerů endocytos bylo zobrazení rozložení intenzity fluorescence v obou emisních kanálech pomocí funkce programu WCIF ImageJ 1.38x „Colour Profiler“. Tato funkce zobrazí profil emisních signálů na úsečce, která byla vedena přes část buňky (úsečka je zobrazená na obrázcích buněk) do grafu. V těchto grafech je vynesena intenzita fluorescence jako funkce vzdálenosti. V případě korelace obou signálů lokální zvýšení emise jednoho fluoroforu víceméně kopíruje lokální zvýšení emise druhého fluoroforu. V opačném případě jsou lokální zvýšení emise fluoroforů na sobě nezávislá. Druhým způsobem hodnocení bylo vyhodnocení korelace signálů na celé ploše buňky za použití funkce programu WCIF ImageJ 1.38x „Intensity Correlation Analysis“. Tento výsledek je zobrazen v grafu, kde na osách jsou proti sobě vyneseny intenzity jednotlivých kanálů. Dále je korelace obou kanálů vyjádřena Pearsonovým korelačním koeficientem (R_r). Tento koeficient má rozměr od 1 do -1. Hodnota 1 značí úplnou korelaci. Hodnota -1 značí úplné rozdělení obou veličin (v obraze je tento výsledek prakticky nemožný, přítomnost jednoho signálu by musela negovat přítomnost druhého signálu). Hodnota okolo 0 značí náhodné rozložení obou sond. Barevné podání těchto grafů bylo upraveno v programu GIMP 2.6 (tzn. GNU Image Manipulation Program, freeware) tak, aby bylo při tisku zřetelnější.

U všech mikroskopických fotografií (vždy A1-C1, D1) byl po provedení všech výpočtů pro účely tisku zvýšen jas.

4.8.1 Hodnocení kolokalizace FrpC proteinu s BSA

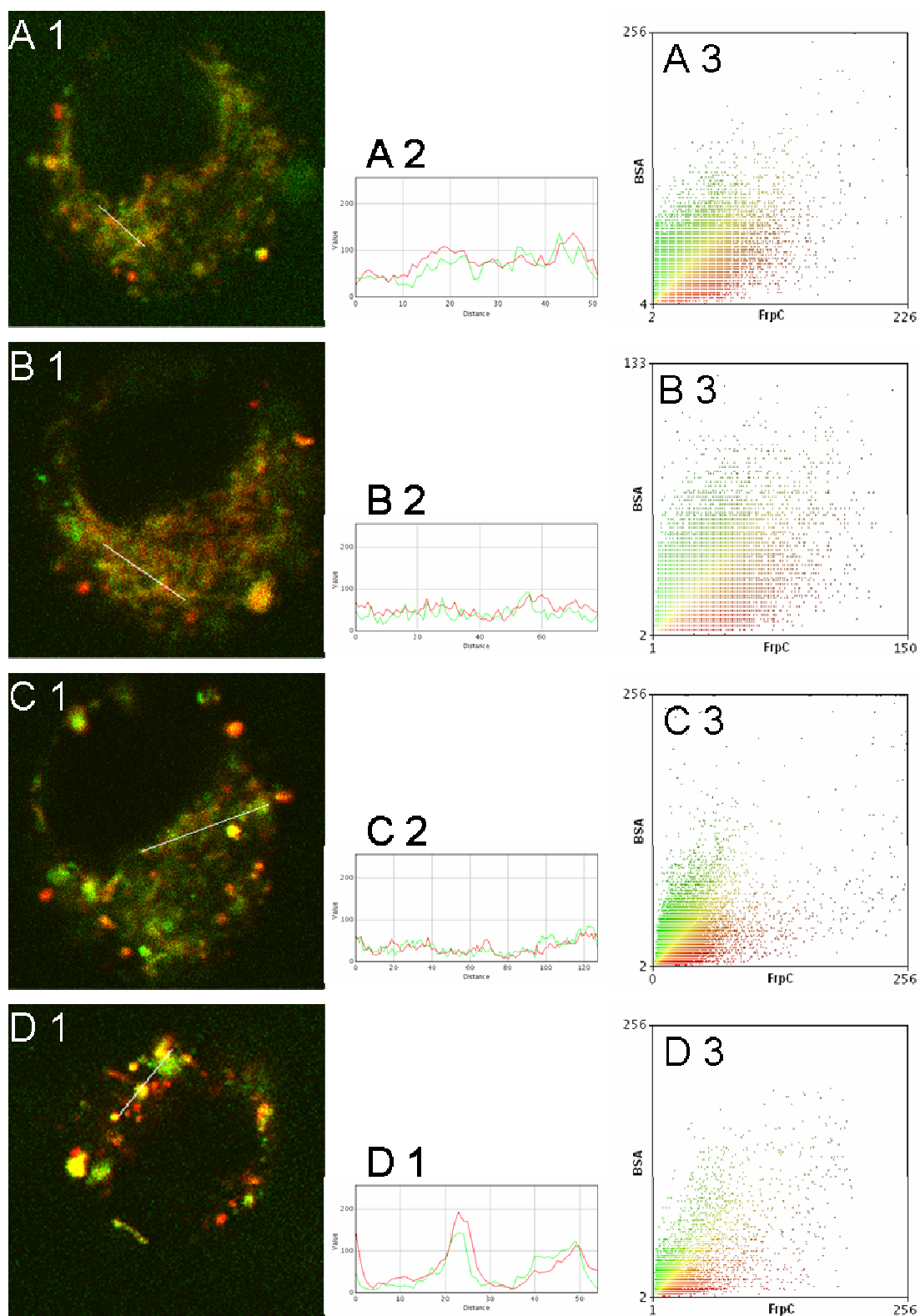
Pro potřeby sledování kolokalizace FrpC proteinu s fluorescenčně značeným BSA (sonda Dyomics DY-547) jako markerem makropinocytosy,

byly makrofágy inkubovány s FrpC (sonda Dyomics DY-647, protein ve finální koncentraci 1,5 $\mu\text{g/ml}$) a BSA (ve finální koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$) po dobu 10 minut. Poté byly buňky opláchnuty čerstvým HBSS s 1% glukosou a sledovány v konfokálním mikroskopu.

Intensita signálu značeného BSA byla velice nízká. Proto bylo nutné konečný obrázek upravit, srovnat hodnoty maxima obou signálů na stejnou úroveň (program ImageJ).

Na obr. 20 jsou zobrazeny výsledky sledování kolokalizace FrpC proteinu s BSA. FrpC i BSA se nacházejí v membránových váčcích, u BSA se jedná o makropinocytosu. FrpC (červená) s BSA (zelená) částečně kolokalizuje. Průměrná hodnota Pearsonova korelačního koeficientu R_r vypočítaná z obr. 20 A3-D3 je 0,6565, což znamená částečnou kolokalizaci obou signálů.

Nelze tedy s jistotou říci, že FrpC protein vchází do buněk makropinocytosou, ačkoliv se určitá část FrpC proteinu nachází v makropinocytických váčcích spolu s BSA.



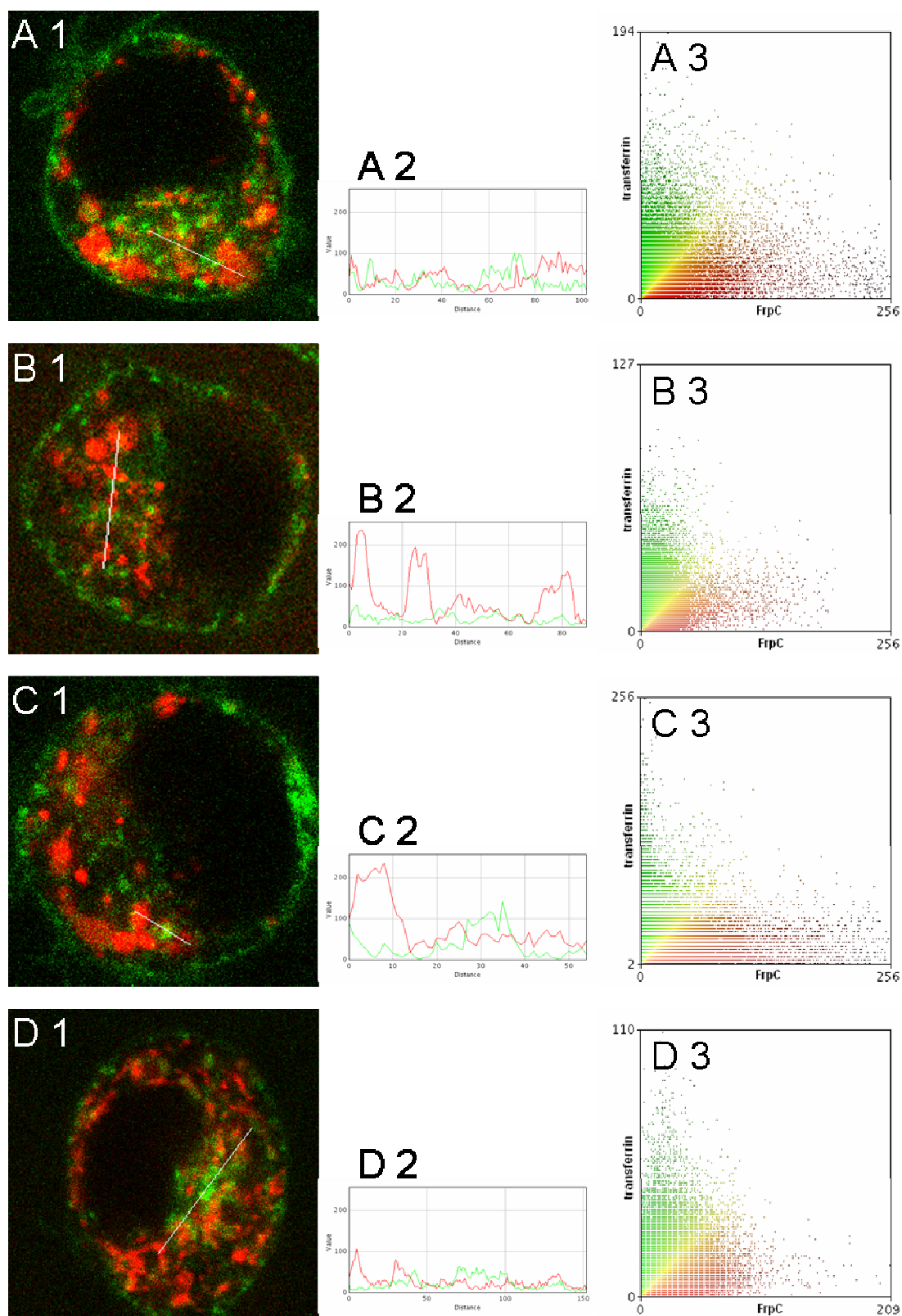
Obr. 20: Interakce FrpC proteinu s buňkami myších makrofágů J774.A1. Sledování kolokalizace FrpC proteinu (červeně na snímku i v grafech) s BSA (zeleně na snímku i v grafech). Na obrázcích A1-D1, které představují různé buňky v témže pokusu, jsou mikroskopické fotografie myších makrofágů linie J774.A1 s internalizovaným FrpC proteinem (červeně) a BSA (zeleně). Žluté body znázorňují orgány, kde se nachází současně FrpC

protein i BSA, tedy místa nejvyšší kolokalizace. Na obrázcích A2-D2 jsou vyneseny intensity obou kanálů (FrpC červeně, BSA zeleně) jako funkce vzdálenosti po délce úsečky vedené přes část buňky (bílá čára). Navzdory nízké intenzitě sondy DY-547 (BSA) je zde patrná závislost intenzit obou signálů. Obrázky A3-D3 představují analýsu kolokalizace obou signálů na celé ploše buňky. Proti sobě zde jsou vyneseny intensity obou kanálů pro jednotlivé pixely. Tento výpočet je odvozen z obrázků A-D. Hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu vypočítané z grafů jsou pro buňku A 0,593, pro buňku B 0,647, pro buňku C 0,654 a pro buňku D 0,732. Tyto hodnoty Pearsonových korelačních koeficientů vypovídají o částečné kolokalizaci FrpC proteinu s BSA. Velikost snímaného obrazu je asi 10x10 μm .

4.8.2 Hodnocení kolokalizace FrpC proteinu s transferrinem

Pro potřeby sledování kolokalizace FrpC proteinu s fluorescenčně značeným transferrinem (FITC), který je do buňky internalisován za použití dráhy závislé na clathrinu, byly makrofágy J774.A1 inkubovány s FrpC (sonda Dyomics DY-647, protein ve finální koncentraci 1,5 $\mu\text{g/ml}$) a transferrinem (ve finální koncentraci 25 $\mu\text{g/ml}$) po dobu 10 minut. Poté byly buňky opláchnuty čerstvým HBSS s 1% glukosou a sledovány v konfokálním mikroskopu.

Na obr. 21 jsou zobrazeny výsledky sledování kolokalizace FrpC proteinu (červená) s transferrinem (zelená). Oba proteiny, FrpC i transferrin, byly internalisovány do buněk, nacházejí se však každý v jiném oddílu buňky. Kolokalizace obou signálů byla velice slabá. Průměrná hodnota Pearsonova korelačního koeficientu R_r vypočítaná z obr. 20 A3-D3 je 0,2345, u jednotlivých buněk se tato hodnota blíží hodnotám náhodného rozmístění signálů. FrpC protein tedy patrně není transportován do buňky drahou závislou na clathrinu. Ani po 40 minutách inkubace s FrpC protein nedostal do váček původně tvořených clathrinem. Receptor pro FrpC protein na eukaryotických buňkách není znám.



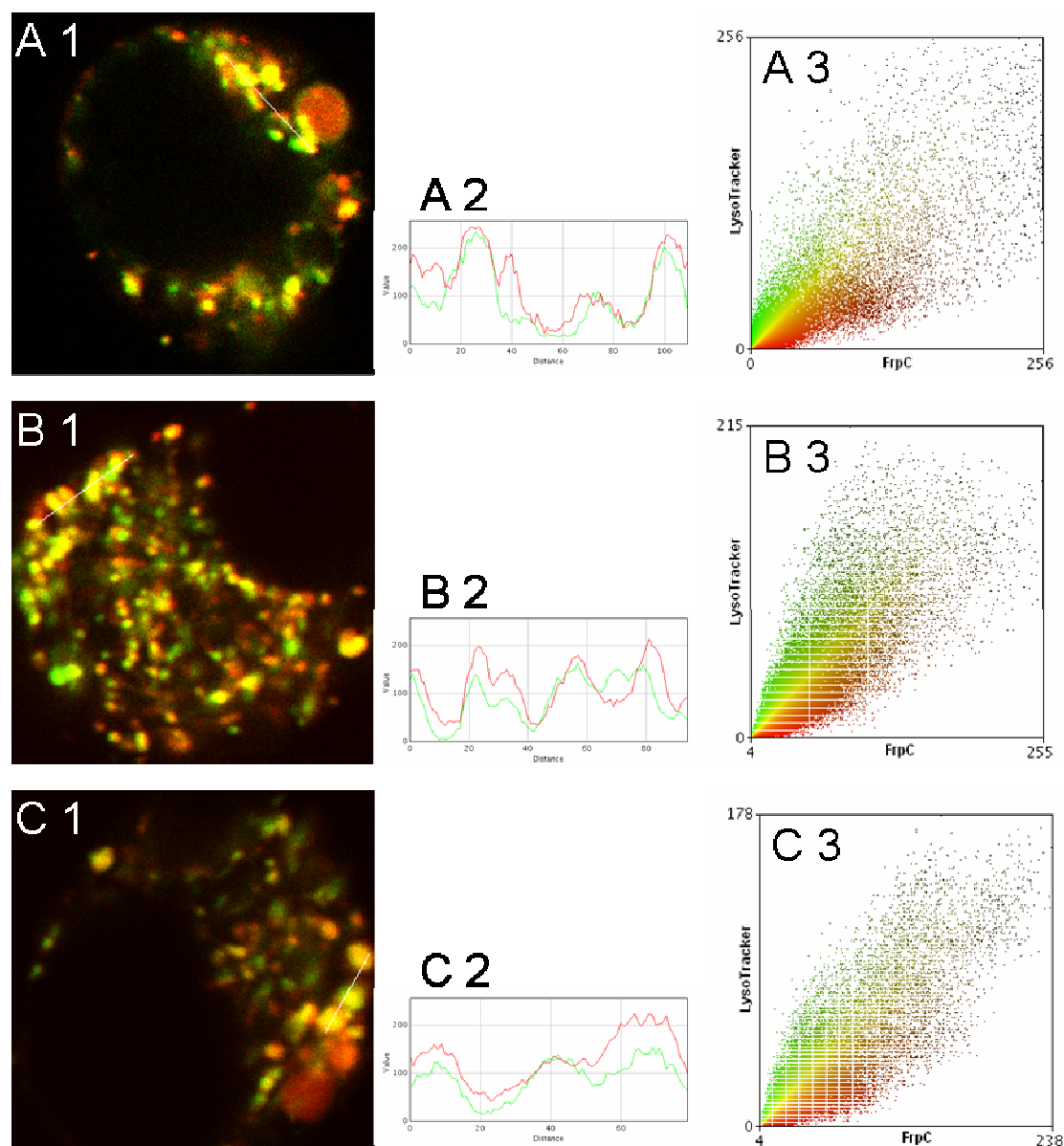
Obr. 21: Interakce FrpC proteinu s buňkami myších makrofágů J774.A1. Sledování kolokalizace FrpC proteinu (červeně na snímku i v grafech) s transferrinem (zeleně na obrázku i v grafech). Na obrázcích A1-D1, které představují různé buňky v témže pokusu, jsou mikroskopické fotografie myších makrofágů linie J774.A1 s internalizovaným FrpC proteinem a

(červeně) a transferrinem (zeleně). Z obrázků samotných je patrné, že prostorová korelace obou signálů není vysoká. Na obrázcích A2-D2 jsou vyneseny intensity obou kanálů (FrpC červeně, BSA zeleně) jako funkce vzdálenosti po délce úsečky vedené přes část buňky (bílá čára). Průběh obou signálů v prostoru nevykazuje žádnou závislost jednoho signálu na druhém. Obrázky A3-D3 představují analýzu kolokalizace obou signálů na celé ploše buňky. Proti sobě zde jsou vyneseny intensity obou kanálů pro jednotlivé pixely. Tento výpočet je odvozen z obrázků A-D. Hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu vypočítané z grafů jsou pro buňku A 0,265, pro buňku B 0,194, pro buňku C 0,094 a pro buňku D 0,385. Tyto hodnoty Pearsonových korelačních koeficientů vypovídají o nízké míře kolokalizace FrpC proteinu a transferrinu, případně o náhodném rozmístění obou signálů. Velikost snímaného obrazu je asi $10 \times 10 \mu\text{m}$.

4.8.3 Hodnocení kolokalizace FrpC proteinu s LysoTracker Red DND-99

Pro potřeby sledování kolokalizace FrpC proteinu s LysoTracker-red DND-99, molekulou specificky značící lysosomy a pozdní endosomy, byly makrofágy J774.A1 inkubovány s FrpC (sonda Dyomics DY-647, protein ve finální koncentraci $1,5 \mu\text{g/ml}$) a LysoTracker-red DND-99 (ve finální koncentraci $5 \mu\text{M}$) po dobu 30 minut. Poté byly buňky opláchnuty čerstvým HBSS s 1% glukosou a sledovány v konfokálním mikroskopu.

Na obr. 22 jsou zobrazeny výsledky sledování kolokalizace FrpC proteinu (červená) s LysoTracker-red DND-99 (zelená). Po inkubaci, která trvala 30 minut, se FrpC protein s vysokou pravděpodobností nacházel organelách s nízkým pH – buď v lysosomech nebo v pozdních endosomech. Kolokalizace obou signálů byla velmi silná. Průměrná hodnota Pearsonova korelačního koeficientu R_r vypočítaná z obr. 22 A3-D3 je 0,8653. Takováto hodnota Pearsonova korelačního koeficientu znamená, že pravděpodobnost společného výskytu signálu FrpC proteinu se signálem LysoTrackeru je vysoká.



Obr. 22: Interakce FrpC proteinu s buňkami myších makrofágů J774.A1. Sledování kolokalizace FrpC proteinu (červeně na snímku i v grafech) s organelami, v nichž je kyselé pH značenými LysoTracker-red DND-99 (zeleně na snímku i v grafech). Na obrázcích A1-C1, které představují různé buňky v témže pokusu, jsou mikroskopické fotografie myších makrofágů linie J774.A1 s internalizovaným FrpC proteinem (červeně) a organelami, v nichž je kyselé pH, které jsou značené LysoTrackerem-red DND-99 (zeleně). Žluté body znázorňují organely, kde se nachází současně FrpC protein i LysoTracker-místa nejvyšší kolokalizace. Na obrázcích A2-C2 jsou vyneseny intenzity obou kanálů (FrpC červeně, BSA zeleně) jako funkce vzdálenosti po délce úsečky vedené přes část buňky (bílá čára). Vzájemná korelace obou signálů je patrná. Obrázky A3-C3 představují grafy s výsledky analýzy kolokalizace obou signálů na celé ploše buňky. Proti sobě zde jsou vyneseny intenzity obou kanálů pro jednotlivé pixely. Tento výpočet je odvozen z obrázků A-D. Hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu vypočítané z grafů jsou pro buňku A 0,844, pro buňku B 0,867 a pro buňku C 0,89. Tyto hodnoty Pearsonových

korelačních koeficientů vypovídají o silné kolokalizaci FrpC proteinu s LysoTrackerem. Velikost snímaného obrazu je asi 10x10 μm .

5 DISKUSE

Tato práce měla za úkol sledovat vliv vápníku na deriváty FrpC proteinu *Neisseria meningitidis* – FrpC Δ RTX a jeho mutantní variantu FrpC Δ RTX-D521K. Mutantní varianta proteinu má v předpokládaném místě vazby vápenatých iontů změněn aminokyselinový zbytek klíčový pro vazbu vápníku – negativně nabitý aspartát byl nahrazen lysinem nesoucím kladný náboj. Vazba vápenatých iontů do vazebných míst FrpC proteinu mimo RTX doménu byla měřena pomocí luminiscenčního analogu vápníku terbia. Navázání terbitých iontů na FrpC protein bylo provázeno zvýšením emise fosforescence terbia. FrpC protein je schopen v přítomnosti terbia vykonávat svou enzymatickou aktivitu, tedy autokatalytické štěpení, stejně jako v přítomnosti vápenatých iontů, na nichž je toto autokatalytické štěpení závislé. Místo pravděpodobně vázající vápenaté ionty na pozici 521 FrpC proteinu, které bylo předmětem zkoumání vazby vápníku v této diplomové práci, bylo předpovězeno na základě sekvenční homologie se strukturou EF-hand motivu, která je funkční strukturou vázající vápenaté ionty v proteinech vázajících vápenaté ionty. Bodová substituce D521K ve FrpC proteinu způsobuje pokles enzymatické aktivity tohoto proteinu (autokatalytické štěpení, OSICKA *et al.*, 2004).

V této práci byla nejprve sledována vazba terbia jako analogu vápníku na deriváty FrpC proteinu: FrpC Δ RTX a FrpC Δ RTX-D521K. Terbium bylo vázáno na zmiňované deriváty FrpC proteinu, přičemž jeho navázání bylo doprovázeno zvýšením emise terbia, což je následek odstínění terbia od molekul vody, které fosforescenci terbia zhasí. V těchto vazebných experimentech (viz kap. 3.2.17 a 4.4) byly zjištěny vazebné parametry (disociační konstanta, k_D , a míra kooperativity vazby, n) FrpC Δ RTX proteinů pro terbium. V případě FrpC proteinu nebylo možné vypočítat vazebné parametry přímo pro vápník, jak by tomu mohlo být, kdyby bylo terbium možné excitovat rezonančním přenosem energie FRET (BASU *et al.*, 2003). V případě FrpC proteinu nedochází k zesílení emise vlivem FRET při excitaci těchto aminokyselin ($\lambda_{ex} = 295$ nm) oproti přímé excitaci terbia ($\lambda_{ex} = 240$ nm). Nemutovaná varianta proteinu FrpC Δ RTX vázala terbité ionty s nižší hodnotou

disociační konstanty ($k_D = 76 \mu\text{M}$) než mutovaný protein FrpC Δ RTX-D521K ($k_D = 111 \mu\text{M}$). Nemutovaný protein tedy tvoří komplex s těmito kovovými ionty při jejich nižší koncentraci oproti mutovanému proteinu, kde je jedno z předpokládaných vazebných míst vápenatých iontů pravděpodobně zrušeno. Z výsledků přitom není a nemůže být zcela jasné, kolik iontů terbia je na protein navázáno. Tyto naměřené hodnoty disociačních konstant tedy platí pro ionty terbia a daný protein jako celek, vazebné parametry různých vazebných míst se od sebe mohou lišit. Z výsledků vyplývá, že mutantní protein postrádající jedno z vazebných míst pro vápenaté ionty má celkovou nižší schopnost vazby iontů terbia, což potvrzuje předpoklad, že bodovou substitucí D521K ve FrpC proteinu bylo ovlivněno vazebné místo pro vápník. Míra kooperativity vazby byla v případě proteinu FrpC Δ RTX $n = 0,65$ a v případě FrpC Δ RTX-D521K $n = 0,69$. Mutací tedy patrně nebyla pozměněna schopnost proteinu navazovat kovové ionty s určitou mírou kooperativity vazby, protože v nemutovaném a mutovaném proteinu se míra kooperativity vazby podstatně neliší. Emise terbia v FrpC Δ RTX proteinu je oproti mutantní variantě FrpC Δ RTX-D521K celkově vyšší a je možné, že se vazebná místa u těchto dvou proteinů liší i svou expozicí k vodnému prostředí, protože emise terbitých iontů je závislá na odstínění molekul vody, které působí na terbium jako zhášec. Různou emisí terbia je také možné zdůvodnit tím, že FrpC Δ RTX a FrpC Δ RTX-D521K vážou jiný počet iontů terbia, což ovlivňuje jeho celkovou emisi.

Ucelenější představu o vazbě kovových iontů na tyto dva deriváty FrpC proteinu poskytují výsledky experimentů, kdy navázané ionty terbia byly vytěšňovány vápenatými ionty. K nahrazení iontu terbia přirozeným ligandem proteinu, vápníkem, dochází obecně tehdy, když se vápník v prostředí proteinu nachází v dostatečně velké koncentraci, aby byl schopen iont terbia vytěšnit. U nemutovaného proteinu FrpC Δ RTX bylo pod vlivem vysoké koncentrace CaCl_2 odstraněno pouze 20 % iontů terbia, zbylých 80 % terbitých iontů zůstávalo navázaných na FrpC Δ RTX protein. Tyto terbité ionty byly tedy navázány ve vazebných místech, která nebyla pro vápenaté ionty dostupná. FrpC Δ RTX protein, kde jsou přítomná všechna původní vazebná místa pro vápenaté ionty FrpC proteinu mimo RTX doménu, tedy patrně vlivem navázání kovových iontů prochází konformační změnou či řadou konformačních změn, které vedou ke

změně struktury proteinu vedoucí k „uschování“ těchto iontů dovnitř struktury proteinu. V mutantní variantě FrpC Δ RTX-D521K proteinu bylo oproti tomu možné odstranit 100 % navázaných terbitých iontů. V tomto mutantním proteinu jsou tedy všechna vazebná místa dostupná pro vápník a pro tento fakt by hovořila i výše zmiňovaná nižší míra emise terbia navázaného na protein – ionty terbia navázané v takovém místě by byly hůře odstíněné od vlivu zhášení molekul vody.

Sledování konformačních změn FrpC proteinů vlivem vápenatých iontů pomocí sledování změny anizotropie fluorescence aminokyseliny tryptofanu ukázalo, že FrpC Δ RTX oproti FrpC Δ RTX-D521K prochází konformační změnou v přítomnosti 200 μ M CaCl₂. U FrpC Δ RTX-D521K proteinu byla přidávkou 200 μ M CaCl₂ vyvolána změna anizotropie na hranici schopnosti detekce (viz obr. 15). Touto konformační změnou je podle výsledků měření změny anizotropie fluorescence tryptofanu nejspíše tvorba kompaktnější struktury FrpC Δ RTX proteinu v přítomnosti vápenatých iontů oproti rozvolněnější struktuře v prostředí bez vápenatých iontů – po přidávku 200 μ M CaCl₂ se anizotropie fluorescence tryptofanu zvýšila. Taková změna konformace proteinu závislá na navázání vápenatých iontů je nejen přirozená pro protein, který váže vápník (jako např. změna konformace RTX domény RTX proteinů po navázání vápenatých iontů, RHODES *et al.*, 2001), ale je také pochopitelná v souvislosti s enzymatickou aktivitou FrpC proteinu, tedy autokatalytickým štěpením závislým na přítomnosti vápníku (OSICKA *et al.*, 2004). Z výsledků této práce nevyplývá konkrétní význam sledovaného místa pro vazbu vápenatých iontů pro aktivitu FrpC proteinu, tedy zda je Ca²⁺ pouze činitelem zprostředkujícím primární konformační změnu proteinu, nebo ovlivňuje-li přímo proces autokatalytického štěpení, případně jsou-li oba tyto procesy úzce spjaty, je však jisté, že vazba vápenatých iontů v tomto místě je pro tyto procesy nezbytná.

Pomocí software Rosetta bylo modelováno vazebné místo pro vápník v pozici 521 FrpC proteinu, které bylo předmětem vazebných experimentů s terbiem prezentovaných v této práci. Očekávanými výsledky tohoto *in silico* experimentu byly struktury vazebného místa v pozici 521 FrpC proteinu. Ve

wild-type FrpC proteinu je na pozici vazebného místa pro vápník aminokyselina aspartát, který se podílí na vazbě vápenatého iontu. Tato kyselina má negativní náboj, který je bodovou substitucí D521K změněn. Tato změna způsobuje snížení vazby vápníku v tomto místě a FrpC protein s touto mutací není schopen vykonávat svou enzymatickou aktivitu, autokatalytické štěpení. Molekulární 3D modelování vazebného místa pro vápník mělo také zobrazit strukturu předpokládané EF-hand struktury pentagonální bipyramidou (MUKHERJEE *et al.*, 2004). Výsledné vítězné struktury, zejména struktury s nejpevnější vazbou vápníku, však tomuto modelu spíše neodpovídaly: boční řetězce prvního a posledního aminokyselinového zbytku ve smyčce EF-hand struktury, které mají vázat vápenatý iont, ve většině případů mířily od vápníku, který byl programem Rosetta virtuálně navázán do modelované struktury peptidového řetězce a výsledná struktura byla vybrána na základě skóre ligandu jako struktura s „dobře“ vázaným vápenatým iontem. Druhým důvodem je skutečnost, že vápník připojený na fragment byl vázán především na různá místa mimo domnělou strukturu vazebného místa EF-hand struktury. Podle modelovaných struktur tato vazebná místa pro vápník nevázála vápenatý iont prostřednictvím aspartátu na pozici 521 FrpC proteinu. Vliv aspartátu v pozici 521 FrpC proteinu na vazebné místo pro vápník by byl pouze na uspořádání sekundární struktury proteinu. Důvodem takového výsledku může být stále příliš malá velikost modelovaného peptidu a jeho preferenční sbalování na základě co nejnižší energie. Ačkoliv tato tendence není tak patrná jako u 29ti aminokyselinového peptidu, může i zde mít velký vliv na uspořádání modelovaného peptidu, protože program Rosetta preferuje kompaktní struktury s hydrofobními částmi peptidu ukrytými dovnitř peptidu (PESKO a RINGE 2004). Navíc to, že předpokládaná „správná“ struktura nebyla nalezena, neznamená, že nemůže být nalezena prostřednictvím molekulárního modelování pomocí programu Rosetta. Proces modelování struktur a navazování iontů na struktury je velice časově náročný a výpočetně složitý a patrně by požadoval více než náhodné navazování 50 iontů vápníku o velké prostorové toleranci (3 nm). Výsledky 3D modelování vazebného místa pro vápník ve FrpC proteinu tedy nelze s jistotou interpretovat. To, že většina struktur neodpovídá předpokládanému klasickému vazebnému motivu (EF-hand), neznamená, že se mezi náhodně vygenerovanými strukturami

nenachází „správná“ struktura, např. v klastru s nižším skóre ligandu. Také to nemusí znamenat špatně zvolené výchozí podmínky (krátká sekvence) nebo „selhání“ na straně Rosetta software, která nedokázala tuto strukturu správně modelovat. Ani reálnost modelovaných struktur s navázaným vápenatým iontem není možné posoudit, protože struktura FrpC proteinu není známá a není k dispozici hodnotící a vyhledávací kritérium, podle kterého by bylo možné tyto struktury jednoznačně posoudit. Ve skutečnosti může být téměř jakákoliv z mnoha náhodných struktur skutečnou strukturou vazebného místa pro vápník ve FrpC proteinu. Jak již bylo uvedeno v úvodu této metody, rozhodování o parametrech, které by rozlišily mezi „špatnými“ a „správnými“ modelovanými strukturami je stále předmětem výzkumu. Bez bližší znalosti struktury proteinu (např. na základě rentgenostrukturní analýzy) lze jen stěží posoudit správnost nalezených struktur nebo zvolit z deseti tisíc náhodně vygenerovaných struktur strukturu nejbližší podobnou skutečnosti.

Protože FrpC protein patří do rodiny RTX proteinů, které mají často funkci exotoxinů a interagují s cílovými buňkami, chtěli jsme ověřit, zda bude FrpC protein také s eukaryotními buňkami interagovat. Sledování interakce fluorescenčně značeného FrpC proteinu s buňkami myší makrofágové linie J774.A1 přinesly překvapivé výsledky, protože FrpC proteiny byly do buněk endocytovány. Předpokládali jsme totiž, že FrpC protein bude adherovat na povrch buněk, aniž by byl do buněk vnesen (LINHARTOVÁ, osobní sdělení). Původním cílem sledování interakce fluorescenčně značeného FrpC proteinu s buňkami myší makrofágové linie J774.A1 bylo tedy vysvětlení tohoto jevu, protože se zde nabízela možnost, že biologická funkce FrpC proteinu, která zůstává stále neznámá, je vykonávána právě na povrchu buňky.

Po zjištění, že je FrpC protein značený fluorescenční sondou Dyomics DY-647 endocytován do buněk myší makrofágové linie J774.A1, bylo cílem popsat možný způsob internalizace FrpC proteinu do buňky. Byla sledována kolokalizace značeného FrpC proteinu s fluorescenčně značenými markery endocytických drah. K tomuto účelu bylo využito fluorescenčně značené BSA (hovězí sérový albumin) jako marker makropinocytosy, fluorescenčně značený transferrin jako marker endocytosy po vazbě na receptor, váčky jsou tvořeny clathrinem a LysoTracker-red DND-99, který označí „kyselé“ organely – pozdní endosomy, lysosomy a recyklující endosomy.

Při sledování FrpC proteinu s transferrinem nebyla sledována žádná kolokalizace (viz obr. 21), FrpC protein tedy není internalizován endocytosou závislou na clathrinu po vazbě na receptor. FrpC protein vykazuje částečnou kolokalizaci s BSA (viz obr. 20), je tedy pravděpodobné, že aspoň část tohoto proteinu je do buňky vnesena makropinocytosou, což je nespecifický děj. Kolokalizace značeného FrpC proteinu s LysoTracker-red DND-99 byla vyhodnocena jako vysoká míra kolokalizace (viz obr. 22). To znamená, že po určité době v buňce FrpC protein končí v kyselých kompartmentech – lysosomech nebo pozdních endosomech. Zde se projevuje rozdíl mezi FrpC proteinem a jiným RTX proteinem, adenylátcyklasovým toxinem bakterie *Bordetella pertussis* CyaA. CyaA je dobře prozkoumaný protein, který se váže na oligosacharidy glykosylovaného β 2 integrinového receptoru CD11b/CD18 (MOROVA *et al.*, 2008). Modifikovaný toxoid (CyaA-MalE-OVA-AC⁻, detoxifikovaný protein), který má sloužit k dopravování požadovaných epitopů do antigen prezentujících buněk (SIMSOVA *et al.*, 2004), je endocytován váčky závislými na clathrinu, ale nenachází se v makropinocytických váčkách (FIŠER *et al.*, připraveno k publikaci).

Experimenty v této diplomové práci, ačkoliv přinesly konkrétní výsledky, nelze s jistotou zobecňovat. Jelikož je biologická funkce FrpC proteinu neznámá, neznáme ani cílové buňky, na které má FrpC protein při vykonání své biologické funkce působit. Receptor pro vazbu FrpC proteinu na eukaryotických buňkách není znám. Dalším sporným bodem v těchto experimentech je skutečnost, že rekombinantní protein purifikovaný z *E. coli* nemusí být funkční pro vykonání své biologické funkce. Známe sice aktivitu tohoto proteinu, tedy autokatalytické štěpení v přítomnosti vápenatých iontů, ale lze spekulovat i o další neznámé biologické funkci. Stanovení autokatalytické funkce však nemusí být reálné v tom smyslu, že nativní protein produkovaný přirozeným producentem *Neisseria meningitidis* v místě infekce může požadovat další aktivující faktory, které nejsou známé a pro produkci rekombinantního proteinu dostupné (jako např. acylace CyaA proteinu *Bordetella pertussis*) (BASAR *et al.*, 2001). Stav a životaschopnost FrpC proteinu nelze testovat na schopnost provádět svou biologickou funkci (jako je např. hemolysa u CyaA proteinu *Bordetella pertussis*) (LADANT a ULLMANN

1999). Rekombinantní FrpC protein používaný pro naše konfokální studie tedy nemusí zcela odpovídat proteinu, který produkuje *Neisseria meningitidis*.

6 SOUHRN

První část této diplomové práce se věnovala popisu vazebných parametrů vazebných míst pro ionty terbia na FrpC proteinu mimo RTX doménu u dvou variant tohoto proteinu: FrpC Δ RTX a FrpC Δ RTX-D521K.

- u FrpC Δ RTX je disociační konstanta pro ionty terbia nižší než u FrpC Δ RTX-D521K, což nejspíše znamená, že u mutované varianty FrpC Δ RTX-D521K chybí vazebné místo pro vápenaté ionty
- vazba iontů terbia měla nekooperativní charakter

Sledování konformačních změn FrpC proteinů navázáním vápenatých iontů má tyto výsledky:

- u FrpC Δ RTX proteinu dochází po navázání vápenatého iontu k rigidizaci struktury proteinu, po navázání iontů terbia lze pouze 20 % navázaných iontů vytěsnit vápníkem
- u FrpC Δ RTX-D521K proteinu ke konformačním změnám nedochází, vápníkem lze odstranit 100 % navázaného terbia

Výsledkem molekulárního 3D modelování byly struktury fragmentů FrpC_502-551 a FrpC-D521K_502-551 proteinu FrpC s navázaným vápníkem:

- u těchto struktur nebyla nalezena předpokládaná struktura klasického vazebného místa pro vápník (EF-hand)
- rozdíl v síle vazby vápenatého iontu na tyto struktury nebyl potvrzen

Sledování interakce fluorescenčně značeného FrpC proteinu s buňkami myší makrofágové linie J774.A1 odhalilo tyto skutečnosti:

- FrpC protein je do těchto buněk internalizován nejpravděpodobněji makropinocytosou
- FrpC protein se do buněk nedostává endocytosou závislou na clathrinu
- po 40 minutách interakce s buňkou se FrpC protein nachází v kyselých kompartmentech – lysosomech nebo pozdních endosomech

7 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Barrett, D. J. (2006). Linux - Kapesní přehled. Brno, Computer Press, a.s.
- Basar, T., V. Havlicek, S. Bezouskova, M. Hackett a P. Sebo (2001). "Acylation of lysine 983 is sufficient for toxin activity of Bordetella pertussis adenylate cyclase. Substitutions of alanine 140 modulate acylation site selectivity of the toxin acyltransferase CyaC." J Biol Chem **276**(1): 348-54.
- Basler, M., I. Linhartova, P. Halada, J. Novotna, S. Bezouskova, R. Osicka, J. Weiser, J. Vohradsky a P. Sebo (2006). "The iron-regulated transcriptome and proteome of Neisseria meningitidis serogroup C." Proteomics **6**(23): 6194-206.
- Basu, G., M. Allen, D. Willits, M. Young a T. Douglas (2003). "Metal binding to cowpea chlorotic mottle virus using terbium(III) fluorescence." J Biol Inorg Chem **8**(7): 721-5.
- Bauche, C., A. Chenal, O. Knapp, C. Bodenreider, R. Benz, A. Chaffotte a D. Ladant (2006). "Structural and functional characterization of an essential RTX subdomain of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin." J Biol Chem **281**(25): 16914-26.
- Baumann, U., S. Wu, K. M. Flaherty a D. B. McKay (1993). "Three-dimensional structure of the alkaline protease of Pseudomonas aeruginosa: a two-domain protein with a calcium binding parallel beta roll motif." Embo J **12**(9): 3357-64.
- Bednář, M., V. Fraňková, J. Schindler, A. Souček a J. Vávra (1996). Lékařská mikrobiologie, Marvil.
- Benz, R., E. Maier, D. Ladant, A. Ullmann a P. Sebo (1994). "Adenylate cyclase toxin (CyaA) of Bordetella pertussis. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of Escherichia coli." J Biol Chem **269**(44): 27231-9.
- Bille, E., J. R. Zahar, A. Perrin, S. Morelle, P. Kriz, K. A. Jolley, M. C. Maiden, C. Dervin, X. Nassif a C. R. Tinsley (2005). "A chromosomally integrated bacteriophage in invasive meningococci." J Exp Med **201**(12): 1905-13.
- Bjorn, M. J., B. H. Iglewski, S. K. Ives, J. C. Sadoff a M. L. Vasil (1978). "Effect of iron on yields of exotoxin A in cultures of Pseudomonas aeruginosa PA-103." Infect Immun **19**(3): 785-91.
- Bonneau, R., J. Tsai, I. Ruczinski, D. Chivian, C. Rohl, C. E. Strauss a D. Baker (2001). "Rosetta in CASP4: progress in ab initio protein structure prediction." Proteins Suppl **5**: 119-26.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Caldwell, C. R. (1989). "Analysis of Aluminum and Divalent Cation Binding to Wheat Root Plasma Membrane Proteins Using Terbium Phosphorescence." Plant Physiol **91**(1): 233-241.
- Cleary, T. G., J. J. Mathewson, E. Faris a L. K. Pickering (1985). "Shiga-like cytotoxin production by enteropathogenic Escherichia coli serogroups." Infect Immun **47**(1): 335-7.

- de Souza, A. L. a A. C. Seguro (2008). "Two centuries of meningococcal infection: from Vieusseux to the cellular and molecular basis of disease." J Med Microbiol **57**(Pt 11): 1313-21.
- DeVoe, I. W. (1982). "The meningococcus and mechanisms of pathogenicity." Microbiol Rev **46**(2): 162-90.
- DeVoe, I. W. a J. E. Gilchrist (1978). "Piliation and colonial morphology among laboratory strains of meningococci." J Clin Microbiol **7**(4): 379-84.
- Finne, J., D. Bitter-Suermann, C. Goridis a U. Finne (1987). "An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues." J Immunol **138**(12): 4402-7.
- Forman, S., I. Linhartova, R. Osicka, X. Nassif, P. Sebo a V. Pelicic (2003). "Neisseria meningitidis RTX proteins are not required for virulence in infant rats." Infect Immun **71**(4): 2253-7.
- Frasch, C. E. (1989). "Vaccines for prevention of meningococcal disease." Clin Microbiol Rev **2** **Suppl**: S134-8.
- Grifantini, R., S. Sebastian, E. Frigimelica, M. Draghi, E. Bartolini, A. Muzzi, R. Rappuoli, G. Grandi a C. A. Genco (2003). "Identification of iron-activated and -repressed Fur-dependent genes by transcriptome analysis of Neisseria meningitidis group B." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(16): 9542-7.
- Gross, M. D., G. L. Nelsestuen a R. Kumar (1987). "Observations on the binding of lanthanides and calcium to vitamin D-dependent chick intestinal calcium-binding protein. Implications regarding calcium-binding protein function." J Biol Chem **262**(14): 6539-45.
- Hofmann, T., S. Eng, H. Lilja, T. Drakenberg, H. J. Vogel a S. Forsen (1988). "Site-site interactions in EF-hand calcium-binding proteins. Laser-excited europium luminescence studies of 9-kDa calbindin, the pig intestinal calcium-binding protein." Eur J Biochem **172**(2): 307-13.
- Hogue, C. W., J. P. MacManus, D. Banville a A. G. Szabo (1992). "Comparison of terbium (III) luminescence enhancement in mutants of EF hand calcium binding proteins." J Biol Chem **267**(19): 13340-7.
- Jarvis, G. A. a N. A. Vedros (1987). "Sialic acid of group B Neisseria meningitidis regulates alternative complement pathway activation." Infect Immun **55**(1): 174-80.
- Jolley, K. A., C. Brehony a M. C. Maiden (2007). "Molecular typing of meningococci: recommendations for target choice and nomenclature." FEMS Microbiol Rev **31**(1): 89-96.
- Kawasaki, H., S. Nakayama a R. H. Kretsinger (1998). "Classification and evolution of EF-hand proteins." Biometals **11**(4): 277-95.
- Kuhnert, P., B. Heyberger-Meyer, A. P. Burnens, J. Nicolet a J. Frey (1997). "Detection of RTX toxin genes in gram-negative bacteria with a set of specific probes." Appl Environ Microbiol **63**(6): 2258-65.
- Ladant, D. a A. Ullmann (1999). "Bordatella pertussis adenylate cyclase: a toxin with multiple talents." Trends Microbiol **7**(4): 172-6.
- Ladokhin, A. S. (2000). Fluorescence Spectroscopy in Peptide and Protein Analysis. Chichester, John Wiley & Sons Ltd.
- Lakowicz, J. R. (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer Science+Business Media.

- Lally, E. T., R. B. Hill, I. R. Kieba a J. Korostoff (1999). "The interaction between RTX toxins and target cells." Trends Microbiol **7**(9): 356-61.
- Lally, E. T., I. R. Kieba, A. Sato, C. L. Green, J. Rosenbloom, J. Korostoff, J. F. Wang, B. J. Shenker, S. Ortlepp, M. K. Robinson a P. C. Billings (1997). "RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells." J Biol Chem **272**(48): 30463-9.
- Lewit-Bentley, A. a S. Rety (2000). "EF-hand calcium-binding proteins." Curr Opin Struct Biol **10**(6): 637-43.
- Ludwig, A., F. Garcia, S. Bauer, T. Jarchau, R. Benz, J. Hoppe a W. Goebel (1996). "Analysis of the in vivo activation of hemolysin (HlyA) from Escherichia coli." J Bacteriol **178**(18): 5422-30.
- Ma, W., K. J. Hwang a V. H. Lee (1993). "A fluorescence quenching method for estimating chelating groups in chelate-conjugated macromolecules." Pharm Res **10**(2): 204-7.
- MacManus, J. P., C. W. Hogue, B. J. Marsden, M. Sikorska a A. G. Szabo (1990). "Terbium luminescence in synthetic peptide loops from calcium-binding proteins with different energy donors." J Biol Chem **265**(18): 10358-66.
- Miller, T. L., L. W. Bennett a D. S. Spatz (1986). "Terbium Luminescence from Complexes of Angiotensin II, Small Peptides, and Amino Acids." Ohio J. Sci. **86** (4): 140-143.
- Morova, J., R. Osicka, J. Masin a P. Sebo (2008). "RTX cytotoxins recognize beta2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(14): 5355-60.
- Mukherjee, S., S. Mustafi, A. A. Sheth, H. S. Atreya a K. V. R. Chary (2004). "NMR Of EF-Hand Calcium Binding Proteins." Proc Indian Natn Sci Acad: 615-625.
- Muzzarelli, R. A. A., R. Rocchetti a G. Marangio (1972). "Separation of Zirconium, Niobium, Cerium and Ruthenium on Chitin and Chitosan Columns for the Determination of Cesium in Nuclear Fuel Solutions." Journal of Radioanalytical Chemistry **10**: 17-25.
- Nassif, X., J. L. Beretti, J. Lowy, P. Stenberg, P. O'Gaora, J. Pfeifer, S. Normark a M. So (1994). "Roles of pilin and PilC in adhesion of Neisseria meningitidis to human epithelial and endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3769-73.
- Nelson, M. R. a W. J. Chazin (1998). "Structures of EF-hand Ca(2+)-binding proteins: diversity in the organization, packing and response to Ca²⁺ binding." Biomaterials **11**(4): 297-318.
- Nelson, M. R. a W. J. Chazin (2001). EF-hand Calcium-binding Proteins. Encyclopedia of Life Science.
- O'Brien, A. D., G. D. LaVeck, M. R. Thompson a S. B. Formal (1982). "Production of Shigella dysenteriae type 1-like cytotoxin by Escherichia coli." J Infect Dis **146**(6): 763-9.
- Omori, K. a A. Idei (2003). "Gram-negative bacterial ATP-binding cassette protein exporter family and diverse secretory proteins." J Biosci Bioeng **95**(1): 1-12.
- Osicka, R., J. Kalmusova, P. Krizova a P. Sebo (2001). "Neisseria meningitidis RTX protein FrpC induces high levels of serum antibodies during invasive disease: polymorphism of frpC alleles and purification of recombinant FrpC." Infect Immun **69**(9): 5509-19.

- Osicka, R., K. Prochazkova, M. Sulc, I. Linhartova, V. Havlicek a P. Sebo (2004). "A novel "clip-and-link" activity of repeat in toxin (RTX) proteins from gram-negative pathogens. Covalent protein cross-linking by an Asp-Lys isopeptide bond upon calcium-dependent processing at an Asp-Pro bond." J Biol Chem **279**(24): 24944-56.
- Petsko, G. A. a D. Ringe (2004). Protein Structure and Function. London, New Science Press Ltd.
- Prochazkova, K., R. Osicka, I. Linhartova, P. Halada, M. Sulc a P. Sebo (2005). "The *Neisseria meningitidis* outer membrane lipoprotein FrpD binds the RTX protein FrpC." J Biol Chem **280**(5): 3251-8.
- Read, R. C., S. Zimmerli, C. Broaddus, D. A. Sanan, D. S. Stephens a J. D. Ernst (1996). "The (alpha2-->8)-linked polysialic acid capsule of group B *Neisseria meningitidis* modifies multiple steps during interaction with human macrophages." Infect Immun **64**(8): 3210-7.
- Rhodes, C. R., M. C. Gray, J. M. Watson, T. L. Muratore, S. B. Kim, E. L. Hewlett a C. M. Grisham (2001). "Structural consequences of divalent metal binding by the adenyl cyclase toxin of *Bordetella pertussis*." Arch Biochem Biophys **395**(2): 169-76.
- Rose, T., P. Sebo, J. Bellalou a D. Ladant (1995). "Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes." J Biol Chem **270**(44): 26370-6.
- Sadilkova, L., R. Osicka, M. Sulc, I. Linhartova, P. Novak a P. Sebo (2008). "Single-step affinity purification of recombinant proteins using a self-excising module from *Neisseria meningitidis* FrpC." Protein Sci **17**(10): 1834-43.
- Sanchez-Magraner, L., A. R. Viguera, M. Garcia-Pacios, M. P. Garcillan, J. L. Arrondo, F. de la Cruz, F. M. Goni a H. Ostolaza (2007). "The calcium-binding C-terminal domain of *Escherichia coli* alpha-hemolysin is a major determinant in the surface-active properties of the protein." J Biol Chem **282**(16): 11827-35.
- Schryvers, A. B. a I. Stojiljkovic (1999). "Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*." Mol Microbiol **32**(6): 1117-23.
- Schwaller, B. (2001). Calcium-binding Proteins. Encyclopedia of Life Science.
- Simsova, M., P. Sebo a C. Leclerc (2004). "The adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*--a novel promising vehicle for antigen delivery to dendritic cells." Int J Med Microbiol **293**(7-8): 571-6.
- Soloaga, A., H. Ostolaza, F. M. Goni a F. de la Cruz (1996). "Purification of *Escherichia coli* pro-haemolysin, and a comparison with the properties of mature alpha-haemolysin." Eur J Biochem **238**(2): 418-22.
- Thompson, S. A. a P. F. Sparling (1993). "The RTX cytotoxin-related FrpA protein of *Neisseria meningitidis* is secreted extracellularly by meningococci and by HlyBD+ *Escherichia coli*." Infect Immun **61**(7): 2906-11.
- Thompson, S. A., L. L. Wang, A. West a P. F. Sparling (1993). "*Neisseria meningitidis* produces iron-regulated proteins related to the RTX family of exoproteins." J Bacteriol **175**(3): 811-8.
- Tzeng, Y. L. a D. S. Stephens (2000). "Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*." Microbes Infect **2**(6): 687-700.

- Vogel, U. a M. Frosch (1999). "Mechanisms of neisserial serum resistance." Mol Microbiol **32**(6): 1133-9.
- Wallace, R. W., E. A. Tallant, M. E. Dockter a W. Y. Cheung (1982). "Calcium binding domains of calmodulin. Sequence of fill as determined with terbium luminescence." J Biol Chem **257**(4): 1845-54.
- West, S. E. a P. F. Sparling (1985). "Response of Neisseria gonorrhoeae to iron limitation: alterations in expression of membrane proteins without apparent siderophore production." Infect Immun **47**(2): 388-94.
- Wooldridge, K. G., M. Kizil, D. B. Wells a D. A. Ala'aldeen (2005). "Unusual genetic organization of a functional type I protein secretion system in Neisseria meningitidis." Infect Immun **73**(9): 5554-67.
- Yazdankhah, S. P. a D. A. Caugant (2004). "Neisseria meningitidis: an overview of the carriage state." J Med Microbiol **53**(Pt 9): 821-32.
- Ye, Y., H. W. Lee, W. Yang, S. J. Shealy, A. L. Wilkins, Z. R. Liu, I. Torshin, R. Harrison, R. Wohlhueter a J. J. Yang (2001). "Metal binding affinity and structural properties of an isolated EF-loop in a scaffold protein." Protein Eng **14**(12): 1001-13.
- Zhang, Y. L., J. A. Frangos a M. Chachivilis (2006). "Laurdan fluorescence senses mechanical strain in the lipid bilayer membrane." Biochem Biophys Res Commun **347**(3): 838-41.
- Zhou, Y., W. Yang, M. Kirberger, H. W. Lee, G. Ayalasomayajula a J. J. Yang (2006). "Prediction of EF-hand calcium-binding proteins and analysis of bacterial EF-hand proteins." Proteins **65**(3): 643-55.