

Abstrakt

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

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