UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie

Vývoj biosenzoru pro fosfatidylinositol

Towards biosensor for phosphatidylinositol

Diplomová práce

Bc. Andrea Eisenreichová

Školitel: Mgr. et Mgr. Evžen Bouřa, Ph.D.

Praha 2017

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Mgr. et Mgr. Evžena Bouři, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne: Podpis:

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli Mgr. et Mgr. Evženu Bouřovi, PhD za jeho odborné vedení, cenné rady, čas a trpělivost. Dále děkuji všem členům laboratoře za ochotu vždy poradit a pomoci. Velký dík patří i mým rodičům nejen za finanční podporu při studiu a mým přátelům a blízkým za psychickou podporu v nelehkých situacích.

Abstrakt

Fosfatidylinositol je minoritním komponentem membrán eukaryotických buněk. Vedle strukturní funkce má i zásadní roli v buněčné signalizaci jako prekursor několika signalizačních molekul a sekundárních poslů. Jedná se o fosfoinositidy, které vznikají fosforylací hydroxylových skupin fosfatidylinositolu v pozicích 3,4 a 5 inositolového kruhu. I přes důležitou roli fosfatidylinositolu však zůstává jeho prostorová a časová a dynamika v buňce nevyjasněná, především z důvodu neexistence odpovídající specifické optické próby (biosenzoru) pro jeho vizualizaci. Pro konstrukci biosenzorů pro inositolové fosfolipidy se využívají lipid-vazebné domény jejich efektorových proteinů s dostatečnou afinitou a specifitou pro daný fosfoinositid. Pro fosfatidylinositol takováto doména není známa, ale je znám enzym, bakteriální fosfatidyl-inositol specifická fosfolipasa C, který se na PI specificky váže. Tento enzym následně katalyzuje hydrolýzu fosfatidylinositolu za vzniku diacylglycerolu a inositol 1-fosfátu a na rozdíl od eukaryotických homologů neštěpí fosforylované formy fosfatidylinositolu.

Cílem této diplomové práce bylo vyřešit modely struktur komplexů několika neaktivních mutantních forem fosfolipasy C z *Bacillus cereus* s *myo*-inositolem, které by dále sloužily jako podklad pro konstrukci geneticky kódovatelného biosenzoru pro fosfatidylinositol založeného na fluorescenci GFP.

Abstract

Phosphatidylinositol is a a minor membrane component of eukaryotic cells, however, it plays a crucial role in cell signaling pathways as a precursor for a number of signaling molecules and second messengers. Among the most significant ones are phosphoinositides created by phosphorylation of the hydroxyl groups of phosphatidylinositol at positions 3,4, and 5 of the inositol ring. Despite its significance, the spatial and temporal distribution and dynamics of phosphatidylinositol remains unclear owing mainly to the lack of a specific optical probe (biosensor) to visualize phosphatidylinositol in living cells. Biosensor for inositol phospholipids are based on lipid-binding domains of their effector proteins with high enough affinity and specificity for a given phosphoinositide – but nosuch domain is known for PI.

However, an enzyme - phosphatidylinositol-dependent phospholipase C – that specifically recognizes phosphatidylinositol is known. This enzyme catalyzes the hydrolysis of phosphatidylinositol into diacylglycerol and inositol 1-phosphate and unlike eukaryotic homologs does not act upon the phosphorylated forms of phosphatidylinositol.

The main aim of this thesis was to solve the structures of several inactive mutant forms of phospholipase C from *Bacillus cereus* complexed to *myo*-inositol which could be hereafter used in the design of a genetically encoded GFP-based biosensor for phosphatidylinositol. (In Czech)

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK 8
1. ÚVOD 10
1.1 Fosfatidylinositol 10
1.1.1 Struktura fosfatidylinositolu 10
1.1.2 Metabolismus fosfatidylinositolu 11
1.1.3 Fosfoinositidy 13
1.2 Biosenzory 17
1.2.3 Biosenzory pro fosfoinositidy 17
1.3 Fosfatidylinositol-specifická fosfolipasa C 19
1.3.1 Struktura *Bc*PI-PLC 20
1.3.2 Aktivní místo *Bc*PI-PLC 22
1.3.3 Mechanismus působení *Bc*PI-PLC 23
1.3.4 Aktivace *Bc*PI-PLC na fázovém rozhraní 25
2. CÍLE PRÁCE 28
3. PŘÍSTROJE A MATERIÁL 29
3.1 Přístroje a pomůcky 29
3.2 Materiál a chemikálie 30
3.2.1 Roztoky, pufry a média 31
4. METODY 33
4.1 Příprava vektorů pro bakteriální expresi rekombinantních PI-PLC 33
4.1.1 PCR reakce 33
4.1.2 Restrikční štěpení DNA 34
4.1.3 Ligace 34
4.1.4 Transformace buněk *E.coli DH5α* 35
4.1.5 PCR z kolonií 35
4.1.6 Minipreparace plasmidové DNA 36

4.1.7 Sekvenace 36
4.1.8 Cílená mutagenese 37
4.2 Exprese a purifikace PI-PLC 38
4.2.1 Bakteriální exprese 38
4.2.2 Izolace proteinu 39
4.2.3 Purifikace proteinů 40
4.3 Proteinová krystalografie 40
4.3.1 Krystalizace PI-PLC 40
4.3.2 Měření difrakce 41
4.3.3 Vytvoření modelu 41
5. VÝSLEDKY 42
5.1 Příprava vektoru pro bakterální expresi mutantních forem PI-PLC 42
5.2 Exprese a purifikace PI-PLC 44
5.3 Proteinová krystalografie 45
7. DISKUZE 51
8. ZÁVĚR 54
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 55

SEZNAM ZKRATEK

BcPI-PLC	Fosfatidylinositol-specifická fospolipasa C z *Bacillus cereus*
C1/C2 domény	Z angl. cysteine rich
CCP	Z angl. clathrin coated pits
CDP	Cytidindifosfát
CMC	Kritická micelární koncentrace
DAG	Diacylglycerol
ER	Endoplazmatické retikulum
FRET	Försterův rezonanční přenos energie
GA	Golgiho aparát
GB1	Imunoglobulinvazebný protein 1 (z angl. immunoglobulin binding protein)
GFP	Zelený fluorescenční protein (z angl. Green fluorescence protein)
GPI	Glykosylfosfatidylinositol
Ins(1,4,5)P_3	Inositol 1,4,5-trifosfát
MTM1	Myotubularin 1
MTMR	Z angl. myotubularin-related phosphoinositide phosphatase
MVB	Multivesikulární tělísko
TIM	Triosa fosfát isomerasa
OCRL	Protein Loweho okulocerebrorenálního syndromu
PA	Kyselina fosfatidová
PC	Fosfatidylcholin
PE	Fosfatidylethanolamin
PH	Z angl. plecstrin homology
PI	Fosfatidylinositol
PI3P	Fosfatidylinositol 3-fosfát
PI4K	Fosfatidylinositol 4-kinasa
PI4P	Fosfatidylinositol 4-fosfát
PI5P	Fosfatidylinositol 5-fosfát

PI(3,4)P_2	Fosfatidylinositol 3,4-bisfosfát
PI(3,5)P_2	Fosfatidylinositol 3,5-bisfosfát
PI(4,5)P_2	Fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát
PI(3,4,5)P_3	Fosfatidylinositol 3,4,5-trisfosfát
PIKfyve	Fosfoinositid kinasa obsahující FYVE prst
PIP	Fosfatidylinositol fosfát
PIP_2	Fosfatidylinositol bisfosfát
PIS	Fosfatidylinositol synthasa
PI-PLC	Fosfatidylinositol specifická fosfolipasa C
PLA	Fosfolipasa A
PLC	Fosfolipasa C
PTEN	Fosfatasa a tensin homolog
SHIP	Inositol 5-fosfatasa obsahující SH2 doménu (z angl. SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase)
TAG	Triacylglycerol
TGN	Trans Golgiho síť
Wt	Divoký typ (z angl. wild type)

1. ÚVOD

1.1 Fosfatidylinositol

Fosfatidylinositol (PI) je společně s ostatními glycerofosfolipidy základním strukturním lipidem v membránách eukaryotních buněk. Vzácně se objevuje i v prokaryotických buňkách [1]. Jako minoritní lipid se nachází na cytoplasmatické straně plasmatické membrány a intracelulárních membrán. Nejvíce je zastoupen v membránách drsného endoplazmatického retikula, vnitřní mitochondriální membráně a Golgiho aparátu [2]. Zastoupení PI v membránách různých organel (uvedeno v tab. 1.1) bylo určeno na základě lokalizace syntetického aparátu a experimentů se značenými protilátkami [3]. Obvykle se nachází ve vnitřní vrstvě membrány [1].

Vedle strukturní funkce má PI zásadní význam jako prekursor pro sekundární posly a další signální molekuly [1]. V živočišných buňkách je primárním zdrojem kyseliny arachidonové, ze které dále mohou vznikat eikosanoidy včetně prostaglandinů [1]. Fosforylované deriváty PI, fosfoinositidy, které jsou podrobněji popsány v kap. 1.1.3, str. 13, jsou v buňce specificky distribuovány a slouží jako značky jednotlivých membrán nebo jako druzí poslové. Fosfoinositidy či jejich metabolity zprostředkovávají buněčné odpovědi na vnější podněty a mají tak v buňce zásadní roli jako signální molekuly.

Tab. 1.1: *Procentuální zastoupení PI v membránách*. Převzato a upraveno z [4].

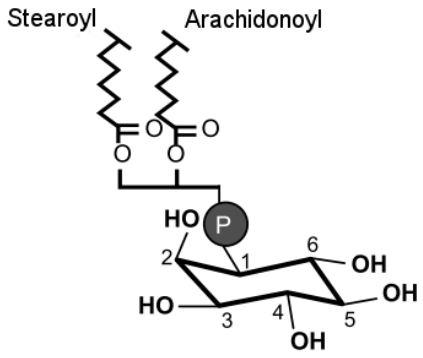
	Hladké ER	Drsné ER	Mitochondrie Vnitřní membrána	Mitochondrie Vnější membrána	Lysosom	Jádro	GA	PM
% PI	8	10,1	1,7	9,2	5,9	4,1	8,7	6,5

ER – endoplazmatické retikulum; GA – Golgiho aparát; PM – plasmatická membrána.

1.1.1 Struktura fosfatidylinositolu

Základem molekuly fosfatidylinositolu je zbytek kyseliny fosfatidové (PA), jejíž fosfátová skupina udílí fosfatidylinositolu negativní náboj. Na sn-3 uhlík PA je fosfodiesterovou vazbou připojen inositol přes svoji 1’ hydroxylovou skupinu. Struktura molekuly fosfatidylinositolu je

znázorněna na obr. 1.1.1. Na sn-1 pozici se nejčastěji objevuje kyselina stearová, na sn-2 kyselina arachidonová [5]. Z devíti možných stereoisomerů inositolu převládá v přírodě *myo*-inositol s jednou hydroxylovou skupinou v axiální poloze [6]. *Myo*-inositol je jako jediný isomer inositolu syntetizován *de novo* [6]. V živočišných a rostlinných buňkách byly nalezeny i lipidy obsahující *chiro*-inositol [6-8], zatímco *scytto*-inositol byl detekován pouze v rostlinných buňkách [9] .



Obr. 1.1.1: *Struktura molekuly fosfatidyl-myo-inositolu*. Převzato a upraveno z [5].

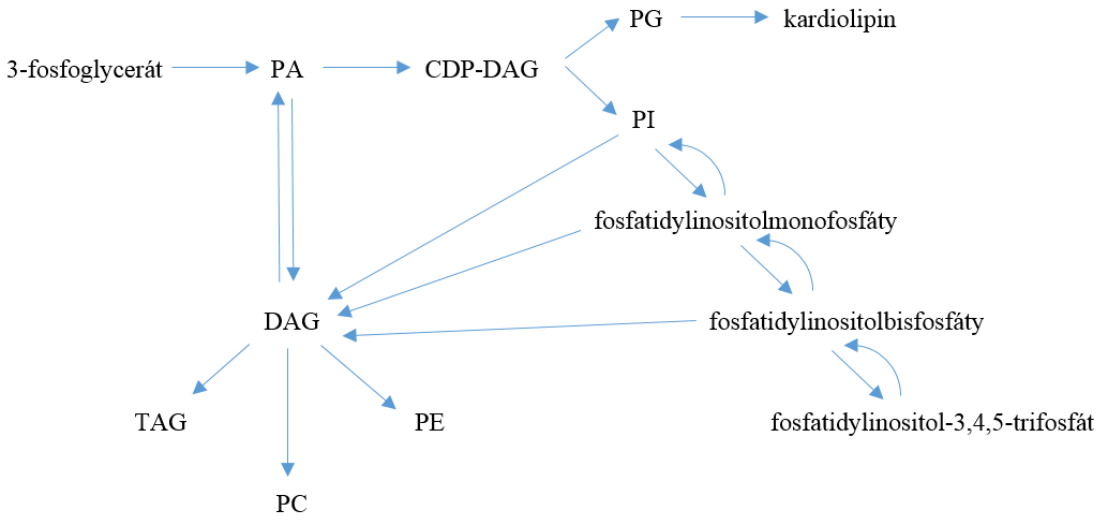
U rostlin a mikroorganismů se mohou vyskytovat i komplexnější inositolové lipidy jako jsou fosfatidylinositol manosidy a sfingolipidy obsahující inositol [4].

Glykosylované formy fosfatidylinositolu (glykosylfosfatidylinositol, GPI) jsou eukaryotickými buňkami využívané jako kotvy membránových proteinů. V molekule GPI je na 6’ hydroxylovou skupinu inositolu navázán oligosacharidový řetězec, tvořený většinou čtyřmi manosovými či glukosovými zbytky [4]. Tato struktura je propojena s proteinem skrze ethanolamin [4].

1.1.2 Metabolismus fosfatidylinositolu

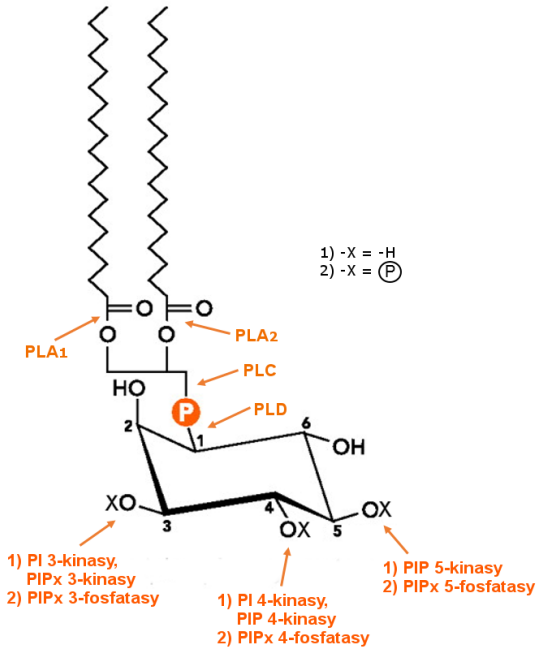
De novo biosyntéza PI je stejně jako biosyntéza ostatních fosfolipidů lokalizována v endoplasmatickém retikulu. PI vzniká přenosem inositolu na aktivovaný diacylglycerol (CDP-DAG), viz obr. 1.1.2, str. 12. Reakce je katalyzovaná PI synthasou (CDP-diacylglycerol–inositol 3-fosfatidyltransferasa) [5]. PI může být syntetizován i vedlejšími cestami, jako je např. výměna bazí [10].

Po syntéze je PI transportován do cílových membrán. To se děje buď prostřednictvím vesikulárního transportu, kdy je PI inkorporován do membrán vesiklu, nebo cytosolovými lipid-transportními proteiny specifickými pro PI (PITPs, z angl. phosphatidylinositol transfer proteins) [10,11].



Obr. 1.1.2: *Schéma metabolismu PI a jeho zapojení do metabolismu fosfolipidů.* Převzato a upraveno z [4,10] . PA – kyselina fosfatidová; CDP-DAG – cytidindifosfát diacylglycerol; PG – fosfatidylglycerol; PI – fosfatidylinositol; DAG – diacylglycerol; PE – fosfatidylethanolamin, PC – fosfatidylcholin; TAG – triacylglycerol.

Fosfatidylinositolové metabolické dráhy mají zásadní význam pro přenos signálu v buňce a zahrnují celou řadu kinas, fosfatas a fosfolipas (obr. 1.1.3, str. 13). Zásadní reakcí je fosforylace PI na hydroxylových skupinách inositolového kruhu za vzniku fosfoinositidů, viz kap. 1.1.3, str. 13. Degradace PI je zajištěna fosfatidylinositol fosfolipasou C (fosfatidylfosfodiesterasa), která katalyzuje hydrolýzu PI na diacyglycerol a inositol 1-fosfát [10]. Diacylglycerol a inositol pak mohou být znovu využity pro syntézu PI. Mechanismus působení bakteriální fosfolipasy C bude podrobněji popsán v příslušné kapitole (1.3.3, str. 19). V některých tkáních (pankreas, mozek) je prvním enzymem katabolismu PI fosfolipasa A, odštěpující mastné kyseliny v sn-1 nebo sn-2 pozicích glycerolu [10].



Obr. 1.1.3: *Enzymy podílející se na metabolismu inositolových fosfolipidů.* Převzato a upraveno z [12,13]. PLA_1 – fosfolipasa A1, PLA_2 – fosfolipasa A2, PLC – fosfolipasa C, PLD – fosfolipasa D, PI – fosfatidylinositol, PIPx – fofoinositid, PIP – fosfatidylinositolfosfát.

1.1.3 Fosfoinositidy

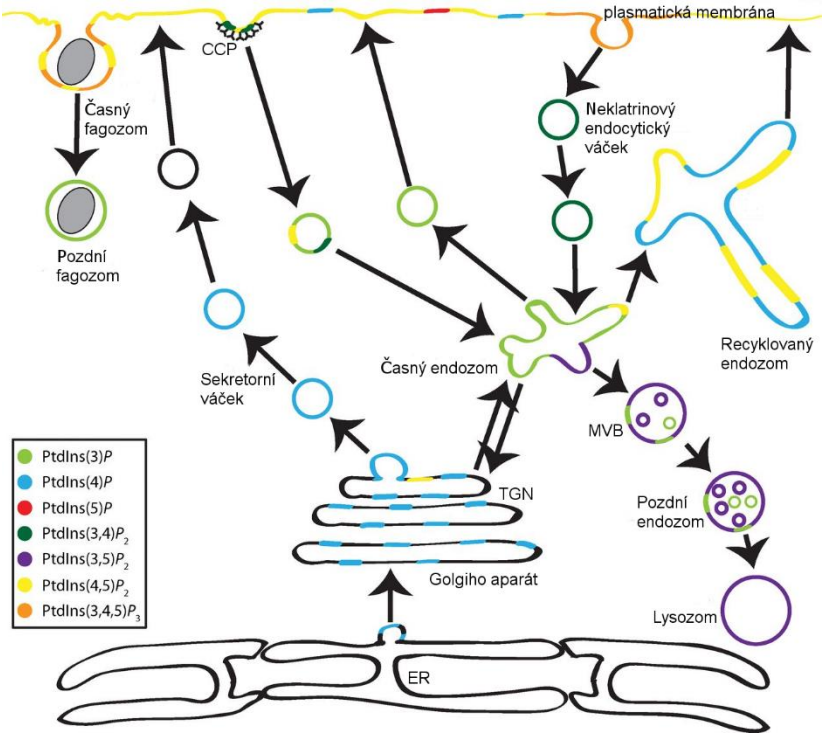
Fosfatidylinositol je prekursorem pro fosfoinositidy, které vznikají fosforylací fosfatidylinositolu na 3,4 a 5 uhlíku *myo*-inositolového kruhu [14]. Fosfatidylinositol může být mono-, di- i trifosforylován. Kombinací všech možností fosforylace může v savčích buňkách vzniknout sedm různých fosfoinositidů a každý z nich má v buňce nezastupitelnou funkci. Podílí se např. na vesikulárním transportu, tvarování membrán, přenosu signálu a organizaci cytoskeletu [15,16].

1.1.3.1 Lokalizace fosfoinositidů

Fosfoinositidy jsou v buňce specificky distribuovány, různé typy převládají na různých organelách a značí organelu, viz obr. 1.1.4, str. 14. Zajišťují tak specifitu membránových interakcí a slouží jako rozpoznávací signál specifický pro jednotlivé buněčné kompartmenty,

pro vazbu cytosolických vazebných partnerů a pro cílení periferálních membránových proteinů na membrány [5].

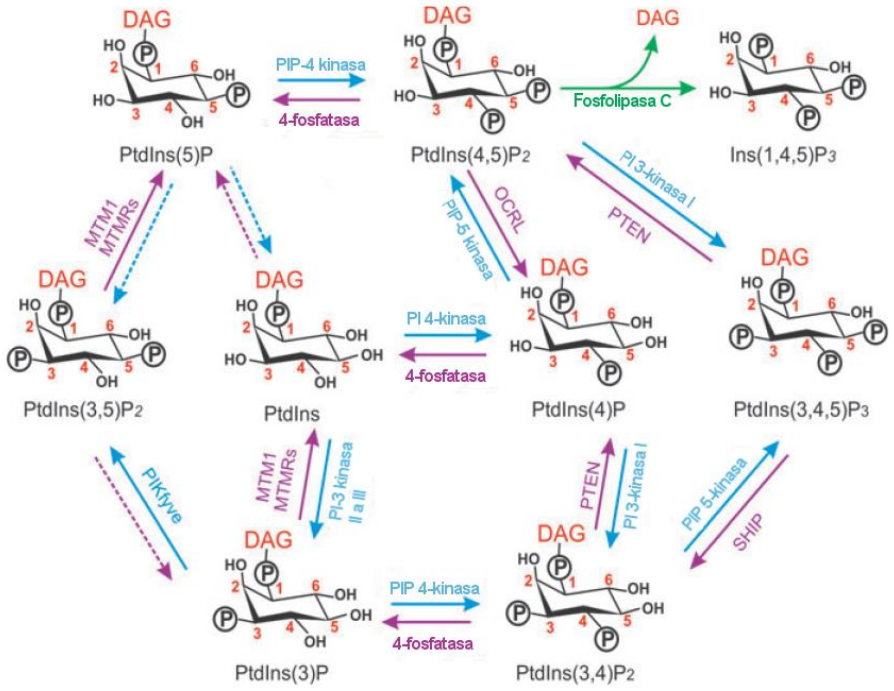
Lokalizace jednotlivých fosfoinositidů byla určena analýzou izolovaných membránových frakcí, či pomocí specifických optických prób (biosenzorů) [17]. Fosfatidylinositol 4-fosfát (PI4P) se nachází na membránách Golgiho aparátu a společně s fosfatidylinositol 4,5-bisfosfátem (PI(4,5)P_2), fosfatidylinositol 3,4-bisfosfátem (PI(3,4)P_2) a fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfátem (PI(3,4,5)P_3) i na plasmatické membráně. PI(4,5)P_2 byl též detekován v jaderné membráně [17]. Fosfatidylinositol 3-fosfát (PI3P) a fosfatidylinositol 3,5-bisfosfát (PI(3,5)P2) se nachází převážně v membránách endosomů a fosfatidylinositol 5-fosfátem (PI5P) v jaderné membráně [16,17].



Obr. 1.1.4: Schéma lokalizace fosfoinositidů na buněčných membránách. Převzato a upraveno z [18]. CCP – z angl. clathrin coated pits; TGN – trans Golgiho síť; ER – endoplasmatické retikulum, MVB – multivesikulární tělísko (z angl. multivesicular body); PtnIns(4)P – fosfatidylinositol 4-fosfát; PtdIns(4,5)P_2 – fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát; PtdIns(3,4)P_2 – fosfatidylinositol 3,4-bisfosfát; PtdIns(3,4,5)P_3 – fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfát; PtdIns(3)P – fosfatidylinositol 3-fosfát; PtdIns(3,5)P2 – fosfatidylinositol 3,5-bisfosfát; PtdIns(5)P – fosfatidylinositol 5-fosfát.

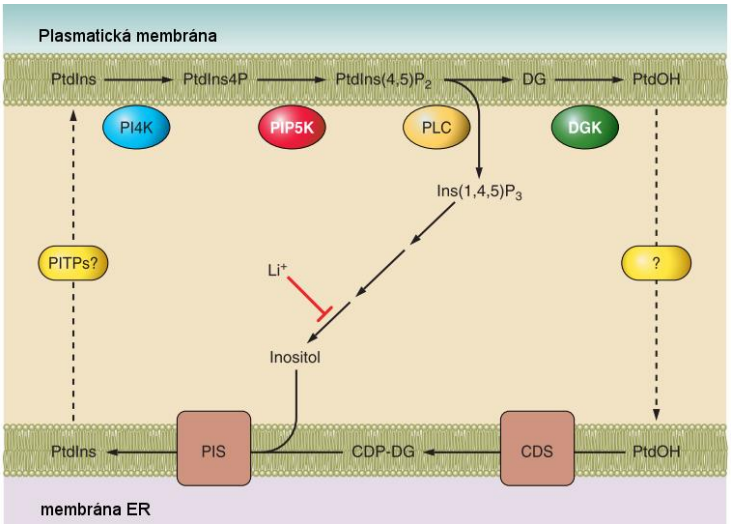
1.1.3.2 Metabolismus fosfoinositidů

Metabolismus fosfoinositidů je jedním z nejdůležitějších prvků buněčné signalizace. Fosfoinositidy mohou být mezi sebou konvertovány, jak je znázorněno na obr. 1.1.5. To zajišťují PI kinasy a fosfatasy[6]. Jejich funkce je důležitá jak pro zachování distribuce fosfoinositidů, tak při regulaci různých buněčných dějů, kdy mohou např. měnit složení fosfoinositidů v závislosti na extracelulárních signálech [19]. Důležitost fosfoinositidů se odráží i v množství enzymů kontrolujících jejich syntézu a degradaci. Ty mohou katalyzovat stejnou reakci, ale lišit se svojí lokalizací a způsobem regulace [20]. Mohou tak přesně regulovat procesy probíhající v rozličných místech buňky.



Obr. 1.1.5: *Interkonverze fosfoinositidů.* Převzato z [19]. Kinasy jou zobrazeny modře, fosfatasy fialově, fosfolipasy zeleně. Přerušovanými čarami jsou zobrazeny pochody, které byly navrženy, ale nebyly doposud charakterizovány.
DAG – diacylglycerol; MTM1 – myotubularin 1; MTMR – z angl. myotubularin-related phosphoinositide phosphatase; PIKfyve – fosfoinositid kinasa obsahující FYVE prst (z angl. FYVE finger-containing phosphoinositide kinase); OCRL – protein Loweho okulocerebrorenálního syndromu; PTEN – fosfatasa a tensin homolog; SHIP – inositol 5-fosfatasa obsahující SH2 doménu (z angl. SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase).

Nejvíce jsou v buňkách zastoupeny $PI(4,5)P_2$ a jeho prekursor, PI4P. $PI(4,5)_2P$ je součástí IP3/DAG signalizační dráhy, jedné z nejrozšířenějších kaskád v buněčné signalizaci. Schéma této dráhy je znázorněno na obr. 1.1.6. Aktivované receptory na povrchu buněk stimulují fosfolipasu C a dochází k hydrolýze $PI(4,5)P_2$ za vzniku DAG a $Ins(1,4,5)P_3$ (inositol 1,4,5-trifosfátu). Oba tyto produkty patří do skupiny sekundárních poslů. Zatímco DAG jako hydrofobní molekula zůstává v membráně a aktivuje proteinkinasu C, $Ins(1,4,5)P_3$ se podílí na regulaci úrovně koncentrace Ca^{2+} v intracelulární prostoru [20].



Obr. 1.1.6: *IP3/DAG signalizační dráha*. Převzato a upraveno z [20]. Po aktivaci PLC dochází k štěpění fosfatidylinositolu. Diacylglycerol je fosforylován na kyselinu fosfatidovou, která je poté přenesena do endoplasmatického retikula. $Ins(1,4,5)P_3$ je defosforylován, což může být inhibováno ionty lithia. Mechanismus tohoto přenosu dosud není znám. V ER z kyseliny fosfatidové a recyklovaného, či *de novo* syntetizovaného inositolu opět vzniká PtdIns, který je přenesen na plasmatickou membránu pravděpodobně za účasti PITPs.
PtdIns – fosfatidylinositol; PI4K – fosfatidylinositol 4-kinasa; PtdIns4P – fosfatidylinositol 4-fosfát; PIP5K – fosfatidylinositol 4-fosfát 5-kinasa; $PtdIns(4,5)P_2$ – fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát; PLC – fosfolipasa C; $Ins(1,4,5)P_3$ – inositol 1,4,5-trifosát; DG – diacylglycerol; DGK – daicylglycerol kinasa; PtdOH – kyselina fosfatidová; CDS – CDP-DG synthasa; PIS – fosatidylinositol synthasa; PITPs – fosfatidylinositol přenášející proteiny (z angl.phosphatidylinositol transfer proteins).

1.2 Biosenzory

Pro sledování buněčných procesů v endogenním prostředí neporušených, živých buněk se využívá geneticky kódovatelných biosenzorů. Obrovským pokrokem v oblasti vizualizace buněčných pochodů byl objev GFP (Zelený fluorescenční protein, z angl. Green fluorescent protein), fluorescenčního proteinu izolovaného z mořských živočichů [21]. Fluorescenční proteiny se ukázaly jako ideální pro vývoj biosenzorů, jednak díky možnosti je geneticky kódovat, čímž odpadá nutnost vnášení fluoforů do buňky, a dále díky existenci více barevných variant, což umožňuje sledovat více procesů v buňce najednou [21].

Biosenzory mohou být použity jak pro sledování lokalizace cílů, tak pro sledování buněčných dějů, jako je změna pH či fosforylace [22]. Byly vyvinuty mutantní formy fluorescenčních proteinů, které zajišťují optimální chování próby v intracelulárním prostředí. Konstrukty pro tyto próby pak mohou být transfekovány do buněk a cíle pozorovány v živých či fixovaných buňkách pomocí fluorescenční či konfokální mikroskopie [22] .

1.2.3 Biosenzory pro fosfoinositidy

Zásadním předpokladem pro signalizační funkci fosfoinositidů je jejich specifická distribuce v různých buněčných kompartmentech. Pro možnost sledování časových a prostorových změn tohoto rozložení byly sestrojeny odpovídající biosenzory. Pro každý z fosfoinositidů je tak již k dispozici optická próba založená na fluorescenčních vlastnostech GFP [20]. Toto však neplatí pro fosfatidylinositol, prekursor všech fosfoinositidů.

Pro konstrukci biosensorů pro fosfoinositidy se využívají lipid-vazebné domény jejich efektorových proteinů fůzované s GFP. PI kinasy, fosfatasy a lipasy se vyznačují vysokou specifitou pro jednotlivé fosfoinositidy. Využití lipid-vazebných domén těchto proteinů je proto nanejvýš příhodné. Mezi tyto domény patří například PH (z angl. plecstrin homology) domény, FYVE domény a C1 a C2 (z angl. cysteine rich) domény [23].

Pro studium lokalizace fosfoinositidů mohou být využity i další, biochemické metody, např. radiochemické značení, použití značených protilátek, chromatografie nebo hmotnostní spektrometrie [19,24]. Tyto metody mohou být optimalizovány pro detekci různých fosfoinositidů [19]. Vyžadují však velké množství buněk pro získání dostatečného signálu a

nedovolují opakovat měření na stejném vzorku buněk. Použití GFP fůzních proteinů jako biosenzorů je na rozdíl od výše zmíněných metod poměrně jednoduché a poskytuje vysoké prostorové i časové rozlišení distribuce fosfoinositidů v jedné buňce. Má však svá omezení. Detekce fosfoinositidů je založena na vysoké stereoselektivitě biosenzorů vůči fosfátovým skupinám na inositolové hlavičce. Ta však může být narušena nespecifickými interakcemi (elektrostatickými či hydrofobními) biosenzoru s membránou či protein-proteinovými interakcemi [19]. Další skutečností, která musí být brána v potaz při interpretaci dat, je fakt, že specifita vůči fosfoinositidům není založena na rozpoznávání diacylglycerolové části fosfoinositidů a do PI vazebných míst biosenzoru se mohou vázat i samotné inositolové molekuly fosforylované na odpovídajících pozicích. Síla fluorescenčního signálu tak nemusí být proporční ke koncenraci fosfoinositidu [20].

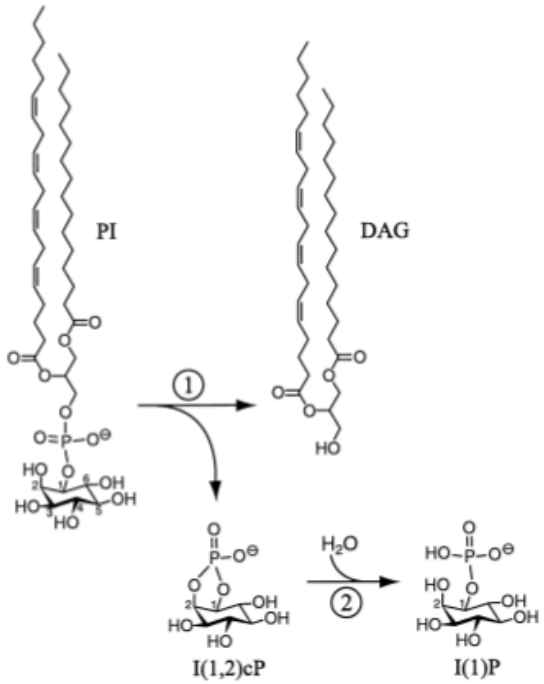
Při použití geneticky kódovaných GFP biosenzorů dochází k „overexpresi“ fůzního proteinu obsahujícího inositid-vazebnou doménu. Vazba fosfoinositidu na biosenzor může mít za následek nedostupnost fosfoinositidu pro jeho buněčné funkce. Lipid-vazebné domény také mohou podporovat funkčně důležité protein-proteinové interakce a zasahovat tak do buněčných pochodů [20].

Vazba domén na fosfoinositidy je závislá na okolním mikroprostředí. Některé domény vážou fosfoinositid jen v určitém subcelulárním kompartmentu a při detekci fosfoinositidů je proto zapotřebí použití více biosenzorů založených na různých lipid-vazebných doménách [23].

1.3 Fosfatidylinositol-specifická fosfolipasa C

Fosfatidylinositol specifická fosfolipasa C je rozmanitá rodina enzymů hydrolyzující fosfatidylinositol. Jsou exprimovány bakteriemi, kvasinkami, prvoky, plísněmi, rostlinami, hmyzem i savci. Eukaryotní PI-PLC je intracelulární, multidoménový protein štěpící fosfoinositidy na membránách za vzniku dvou sekundárních poslů: diacylglycerolu (DAG) a inositol 1,4,5-trifosfátu. Účastní se tak přenosu signálu uvnitř buňky [25].

Bakteriální PI-PLC je malý, ve vodě rozpustný enzym, sekretovaný rozličnými druhy bakterií. Nejmenší PI-PLC (přibližně 35kDa) je exprimována Gram-pozitivními bakteriemi, mezi něž patří i některé lidské patogeny (*Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, Staphylococus aureus*) [26]. Byla však izolována i z nepatogenních kmenů (*Listeria seeligeri, Streptomyces antibioticus*) a z *Cytophaga sp*., což je Gram-negativní, fakultativně anaerobní bakterie [27].



Obr. 1.3.1: *Reakce katalyzovaná bakteriální PI-PLC*. 1) Štěpení PI za vzniku DAG a cyklického *myo*-inositol (1,2)fosfátu. 2) Hydrolýza cyklického *myo*-inositol (1,2)fosfátu za tvorby *myo*-inositol 1-fosfátu (I(1)P). Převzato z [27].

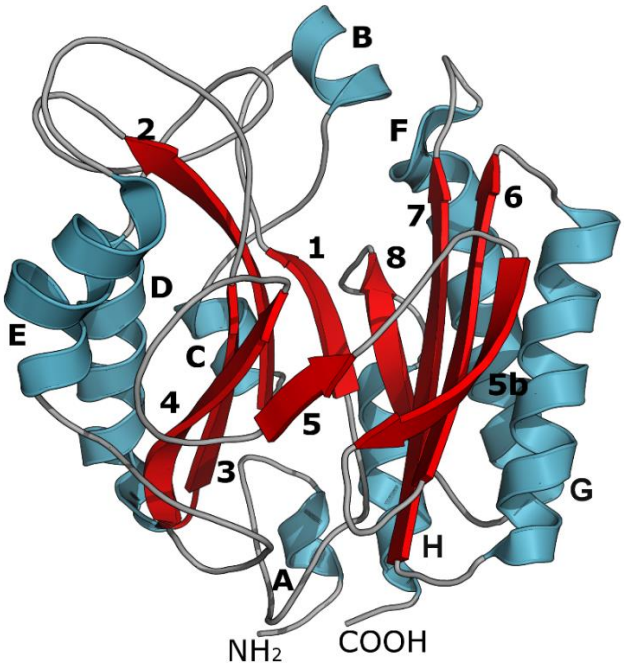
Bakteriální PI-PLC katalyzuje štěpení fosfodiesterové vazby PI, lyso-PI a GPI [28]. Při štěpení PI vzniká *myo*-inositol 1-fosfát a nerozpustný diacylglycerol (viz obr. 1.3.1, str. 19) [27]. Rozpoznává striktně PI, na rozdíl od eukaryotních PI-PLC neštěpí bakteriální PI-PLC fosfatidylinositol fosforylovaný na 4. či 5. uhlíku inositolového kruhu [27].

Protože bakteriální PI-PLC štěpí GPI kotvy proteinů a membránové inositolové fosfolipidy, může jejich aktivita zasahovat do signálních drah eukaryotických buněk a u některých bakteriálních druhů (např. *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) tak může PI-PLC sloužit jako virulenční faktor [29-31]. Díky schopnosti štěpit GPI kotvy může být PI-PLC využita i pro testování přítomnosti proteinů kotvených GPI [32].

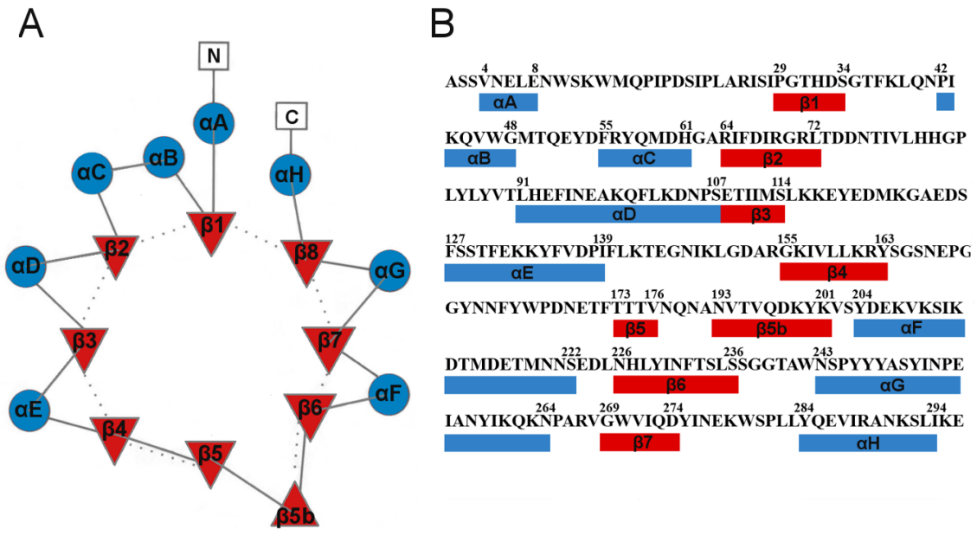
1.3.1 Struktura *Bc*PI-PLC

Jako první byla vyřešena struktura PI-PLC z *Bacillus cereus* (*Bc*PI-PLC) [33]. Dále byly vyřešeny např. struktury enzymů z *Listeria monocytogenes* a *Staphylococus aureus* [34,35]. Bakteriální PI-PLC je i přes nízkou sekvenční homologii topologicky podobná katalytické doméně eukaryotních PI-PLC [36]. Zaujímá uzavřenou strukturu neúplného (βα)8 –barelu (tzv. TIM barel, pojmenovaný dle triosa fosfát isomerasy, kde byl poprvé popsán), kde se pravidelně střídá struktura α-helixu se strukturou skládaného listu, viz obr. 1.3.3, str. 21. C-konec jednoho listu je tak propojen s N-koncem dalšího listu přes α-helikální segment [33,37]. Osm β-skládaných listů vytváří centrální barel obklopený α-helixy (viz obr. 1.3.2, str. 21).

V případě *Bc*PI-PLC je pravidelnost tohoto uspořádání porušena mezi pátým a sedmým β-skládaným listem. Namísto α-helixů je pátý a šestý β-skládaný list propojen smyčkou a šestý a sedmý antiparalelním β-skládaným listem, jak je možné vidět na obr. 1.3.3A, str. 21 [33,37]. Struktura PI-PLC je proto v této oblasti poměrně otevřená.



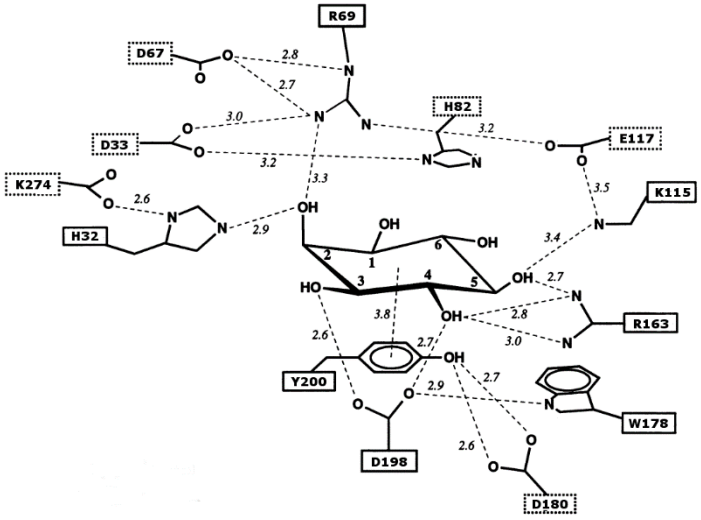
Obr. 1.3.2: *Struktura BcPI-PLC*. PI-PLC zaujímá strukturu neúplného (βα)8 –barelu. α-helixy (A-H) obklopují centrální barel tvořený β skládanými listy (1-8). α-helixy zobrazeny modře, β-skládané listy červeně. Identifikační PDB kód 1PTG [33].



Obr. 1.3.3:*Sekundární struktura BcPI-PLC*. Převzato a upraveno z [33]. α-helixy zobrazeny modře, β-skládané listy červeně. A) Schématické znázornění topologie PI-PLC. B) Primární sekvence *Bc*PI-PLC s vyznačenou sekundární strukturou.

1.3.2 Aktivní místo *Bc*PI-PLC

Aktivní místo *Bc*PI-PLC se nachází na C konci β-barelu a je tvořeno několika polárními a nabitými zbytky [33,37]. Z dostupných krystalových struktur komplexu *Bc*PI-PLC a inositolu je zřejmé, že substrát je v aktivním místě držen vodíkovými můstky mezi hydroxylovými skupinami inositolu a postranními řetězci H32, R69, K115, R163, D198 (viz obr. 1.3.4) [33,38,39]. Tyto aminokyseliny jsou stabilizovány interakcemi s postranními řetězci D67, E117, D180, W178 a D274 [33,37], což zajišťuje poměrně velkou rigiditu aktivního místa a vede tak k vysoké stereoselektivitě enzymu [33]. V některých krystalových strukturách byla pozorována i interakce H82 s D33 [33]. Inositol je dále stabilizován v aktivním místě pomocí patrových interakcí s Y200 [33,37] . Silná koordinace hydroxylových skupin *myo*-inositolu vysvětluje neschopnost bakteriální PI-PLC štěpit PIP a PIP2. Aktivní místo je pro vazbu fosfátových skupin na 4. a 5. uhlíku inositolu příliš úzké a hluboké [37].

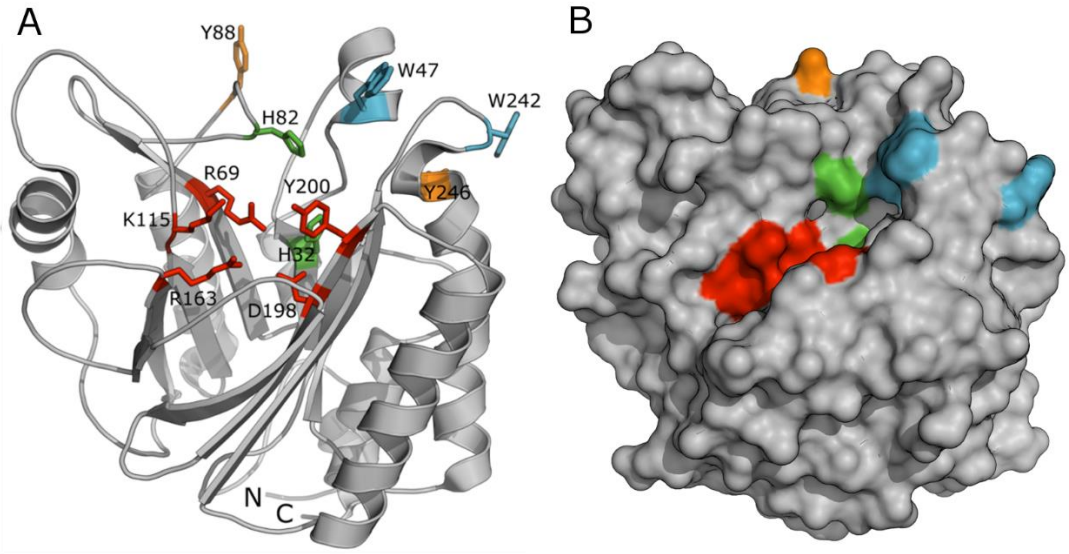


Obr. 1.3.4: *Schématické znázornění aktivního místa PI-PLC v komplexu s myo-inositolem*. Převzato z [33].

Konformace aktivního místa je zachována i mezi sekvenčně poměrně rozdílnými homology PI-PLC, jako jsou fosfolipasy z *Listeria monocytogenes* a *Bacillus cereus* (sekvenční identita jen 22%), a mezi jinak vzdálenými prokaryotickými a eukaryotickými lipasami [27,40]. Většina postranních zbytků zajišťujících interakci se substrátem se nachází

na N konci enzymu, což koresponduje s vyšší sekvenční identitou pro N konec mezi různými PI-PLC [27].

V této oblasti se nachází i několik hydrofobních zbytků, které jsou vystaveny rozpouštědlu. Tyto postranní řetězce se uplatňují při vazbě na membránu a aktivaci PI-PLC, viz níže (kap. 1.3.4, str. 25).



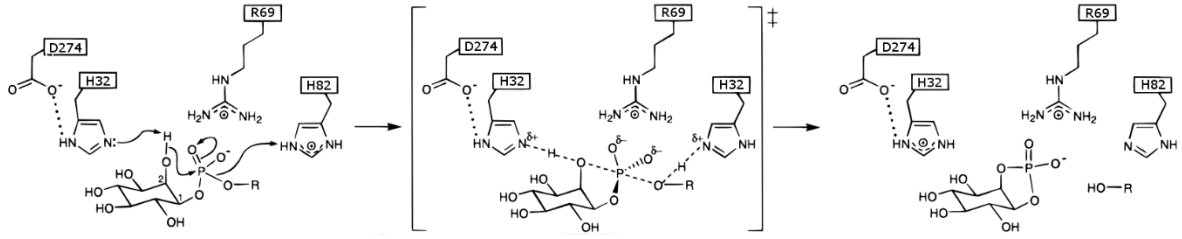
Obr. 1.3.5: *Struktura BcPI-PLC s vyznačenými postranními řetězci zapojujícími se do katalýzy, vazby substrátu nebo vazby membrány v tzv. "cartoon" reprezentaci (A) a "surface" reprezentaci (B).* Katalytické histidiny (H32 a H82) zobrazeny zeleně, postranní zbytky vázající substrát (R69, K115, D198, Y200) červeně, tryptofany (W47,W242) a tyrosiny (Y246 a Y88) vázající membránu modře a oranžově. Identifikační PDB kód 1PTG [33].

1.3.3 Mechanismus působení *Bc*PI-PLC

PI-PLC vykazuje fosfotransferasovou a cyklickou fosfodiesterasovou aktivitu. Reakce katalyzovaná PI-PLC je dvoukroková. V první, rychlé fosfotransferasové reakci dochází ke štěpení PI a uvolnění DAG a cyklického *myo*-inositol (1,2)fosfátu (I(1,2)cP) [41,42], viz obr. 1.3.1., str. 19. V druhém kroku dochází k pomalé hydrolýze cyklického *myo*-inositol (1,2)fosfátu (I(1,2)cP) za tvorby *myo*-inositol 1-fosfátu (obr. 1.3.1) [43,44]. Z důvodu tvorby cyklického meziproduktu je přítomnost volné 2' hydroxylové skupiny v axiální poloze nezbytná pro průběh reakce [42]. PI-PLC vykazuje vysokou stereospecifitu a regioselektivitu.

V první reakci je štěpen pouze D-isomer *myo*-inositolu, L-isomer není ani substrátem, ani inhibitorem reakce [42,45]. V druhé reakci vzniká pouze *myo*-inositol 1-fosfát [44,46,47]. Na rozdíl od vysoké specifity vůči inositolové hlavičce PI, nerozpoznává PI-PLC hydrofobní část PI a štěpí esterové, etherové lipidy, mono- i diacyl lipidy i lipidy odvozené od sfingosinu [41,43,48].

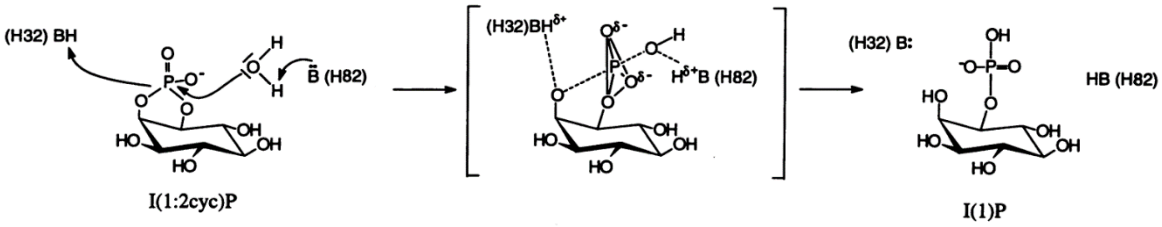
Reakce se řídí mechanismem acidobasické katalýzy za účasti dvou katalytických histidinů, H32 a H82 [39,49], vysoce konzervovaných mezi bakteriálními i eukaryotními PI-PLC [36]. Dusík ε2 imidazolového kruhu H32 je díky interakci H32 a A274 (viz obr. 1.3.4, str. 22) poměrně bazický a může tak přijmout vodík 2'OH skupiny inositolu [33,38]. Kyslík této skupiny je tak aktivován pro nukleofilní atak na atom fosforu PI za vzniku negativně nabitého pentakovalentního transitního stavu. Ten je stabilizován kladným nábojem R69 [38,39]. R69, D33 a H82 vytváří společně katalytickou triadu, kde D33 pomáhá udržovat kladné náboje na R69 a H82 [50]. H82 se chová jako kyselina, odevzdá vodík kyslíku na *sn*-3 pozici PI a protonuje tak odstupující skupinu (DAG [38]). Mechanismus fosfotransferasové reakce je znázorněn na obr. 1.3.6.



Obr. 1.3.6: *Mechanismus fosfotrasnferasové reakce*. Převzato z [38]. Při reakci katalyzované PI-PLC vzniká v prvním kroku DAG a cyklický *myo*-inositol (1,2)fosfát. Reakce probíhá mechanismem acidobazické katalýzy. H32 se chová jako báze a přijímá proton z 2'OH skupiny, což umožňuje nukleofilní atak kyslíku této skupiny na atom fosforu, přičemž H82 odevzdává proton kyslíku fosfátové skupiny. Vzniká pentakovalentní transitní stav, který se rozpadá na produkty reakce. Na reakci se podílejí i D274 a R69.

Vzniklý ve vodě rozpustný cyklický *myo*-inositol (1,2)fosfát pak vstupuje do velmi pomalé hydrolytické reakce (viz obr. 1.3.7, str. 25), která probíhá opačným mechanismem, než je popsáno výše. V tomto případě je kyselinou voda, která odevzdá vodík H82 a ten se tak

vrací do původního stavu [39]. Hydroxylový iont atakuje atom fosforu a opět vzniká pentakovaletní transitní stav [38,39]. Po přenosu vodíku z H32 na atom kyslíku na prvním uhlíku inositolu se enzym regeneruje a uvolňuje se *myo*-inositol 1-fosfát [38,39].



Obr. 1.3.7: *Mechanismus hydrolytické reakce katalyzované BcPI-PLC*. Převzato [33]. H82 odebírá proton vodě. Po ataku hydroxylového iontu na atom fosforu vzniká pentakovalentní transitní stav a po protonaci inositolu se uvolňuje *myo*-inositol 1-fosfát.

1.3.4 Aktivace *Bc*PI-PLC na fázovém rozhraní

Jelikož lipasy jsou hydrofilní enzymy mající hydrofobní substráty, odehrává se reakce na rozhraní mezi vodnou a lipidovou fází. Před samotným průběhem reakce se lipasy vážou na membránu, což zvyšuje rychlost reakce a afinitu lipasy k substrátu [51].

Povaha interfáze má zásadní vliv na aktivitu fosfolipas. PI-PLC stejně jako ostatní lipasy vykazuje nízkou aktivitu při malých koncentracích substrátu, při kterých se substrát nachází v roztoku pouze v monomerní podobě. Aktivita lipas strmě stoupá, pokud je koncentrace substrátu vyšší než tzv. kritická micelární koncentrace (CMC), kdy dochází k jeho agregaci do micel [52].

Pro studium aktivace PI-PLC na fázovém rozhraní byl použit fosfatidylinositol s krátkými řetězci. Jeho výhodou je možnost existence jak v monomerní, tak micelární podobě ve vodném prostředí, a tudíž možnost sledování aktivity PI-PLC na monomerním substrátu. V případě zvýšení koncentrace PI na CMC se aktivita PI-PLC z *Bacillus thuringensis* zvýšila 5-6 krát [42]. Podobné hodnoty byly naměřeny i pro PI-PLC z *Bacillus cereus* [51,53].

Aktivita PI-PLC závisí též na přítomnosti dalších fosfolipidů na fázovém rozhraní. Zwitterionické fosfolipidy, jako je PC a PE, se chovají vůči PI-PLC jako neutrální rozpouštědla, která se vážou na PI-PLC, avšak ne do vazebného místa [51]. Poskytují tak

prostor, kde může docházet k reakci bez narušení vazby substrátu, a ukotvují enzym na membránu [51]. Bakteriální PI-PLC je alosterický enzym, mající jak vazebné místo pro substrát, tak alosterické místo pro aktivátory [54]. V případě vazby PC/PE na rozhraní fází dochází k alosterické modulaci - konformační změně a přechodu enzymu z méně aktivní do více aktivní formy [51,54] a zvýšení afinity PI-PLC jak k substrátům na rozhraní (PI) tak i k rozpustným substrátům (cPI) [54,55]. Při vazbě monomerního PC k tomuto efektu nedochází [54,55]. Neutrální fosfolipidy tak mají dvojí funkci – ukotvují enzym k membráně a zvyšují jeho aktivitu.

U některých periferálních enzymů bylo pozorováno vnoření tryptofanů do dvojvrstvy po vazbě na membránu (např. fosfolipasa A nebo annexin 5) [56,57]. Jak vyplývá z měření tryptofanové fluorescence, v přítomnosti PC dochází ke změně konformace PI-PLC, která ovlivňuje prostředí dvou z celkových sedmi tryptofanů PI-PLC [51]. Aktivní místo PI-PLC je lemováno α-helixem B a smyčkou 237-243 [33], kde se nachází velké množství hydrofobních zbytků, které jsou v kontaktu s rozpouštědlem. Z B-faktorů dostupných krystalových struktur PI-PLC vyplývá, že tato oblast je poměrně flexibilní [33,37]. Dále zahrnuje dva tryptofany PI-PLC (W47 v α-helixu B, W242 ve smyčce 237-243, viz obr. 1.3.5, str. 23. Tato oblast by tedy mohla být zodpovědná za změnu konformace a po vazbě PC se nořit do hydrofobního prostředí membrány. Při experimentech s mutantními formami PI-PLC (W47A, W242A a dvojitý mutant W47A/W242A) byla aktivace PI-PLC fosfatidylcholinem a vazba na membránu podstatně snížena či ztracena [58,59].

Jednou z možností mechanismu aktivace PI-PLC po vazbě PC je oligomerizace enzymu na fázovém rozhraní. Pro studium změny konformace PI-PLC byla Zhangem et al. použita metoda tzv. croslinku [60]. V případě, že jsou jednotlivé molekuly v těsné blízkosti, dojde za použití vhodného činidla k jejich zesíťování a je tak možné detekovat případnou oligomeraci molekul. V případě PI-PLC byly po vazbě na membránu v roztoku detekovány oligomery. Nebylo však prokázáno, že by agregace měla vliv na aktivitu PI-PLC. Byla však pozorována vazba dvou molekul PC jednou molekulou PI-PLC [60].

Hypotéza dimerizace PI-PLC byla podpořena následnými krystalografickými experimenty s mutantní formou PI-PLC, kdy byly oba tryptofany nahrazeny alaninem [61,62]. Interakce mezi monomery byla v tomto modelu zajištěna hydrofobními kontakty aromatických postranních řetězců, především skupinou tyrosinových zbytků v blízkosti aktivního místa

[61,62]. Mutace těchto zbytků měla za následek snížení aktivity enzymu, avšak beze změn v aktivním místě, což naznačuje jejich zapojení do tvorby dimeru nebo vazby PC [63,64]. Následné experimenty (např. FRET) nepotvrdily tvorbu dimeru se zapojením těchto tyrosinových zbytků [64].

Tyrosinové postranní řetězce se mohou, stejně jako další aromatické aminokyseliny, kromě hydrofobních interakcí účastnit i kation-π interakcí [65]. Tyto interakce by se mohly podílet na vazbě fosfatidylcholinu, jehož hlavička obsahuje kvartérní amoniový kation. Na rozhraní mezi PI-PLC a membránou se nachází poměrně velké množství tyrosinů. Nejsilněji vážou PC dle simulace molekulární dynamiky dva z těchto tyrosinů – Y88 a Y246 [65] (znázorněny na obr. 1.3.5, str. 23), což bylo potvrzeno i následnými experimenty s mutantními formami PI-PLC [65] a dalšími experimenty [66-68].

2. CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo získat modely struktur mutantních forem PI-PLC z *Bacillus cereus* v komlexu s *myo*-inositolem, které by byly dále využity pro konstrukci biosenzoru pro fosfatidylinositol. Tohoto cíle bylo dosaženo v několika krocích:

- příprava expresního vektoru pro mutantní formy PI-PLC
- bakteriální exprese PI-PLC
- purifikace mutantních enzymů
- krystalizace mutantů PI-PLC v komplexu s *myo*-inositolem
- rentgenostrukturní analýza a vytvoření modelů struktur komplexů

3. PŘÍSTROJE A MATERIÁL

3.1 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy	Adventurer Pro, Ohaus
Aparatura a zdroj pro horizontální elektroforesu	EV 231, Consort
Aparatura pro vertikální elektroforesu	Mini-PROTEIN Tetra System, Bio-Rad
Bloková lázeň	SBH130D, Stuart
Centrifugy	Centrifuge 5418, rotor FA-45-18-1, Eppendorf Allegra X-15 R Centrifuge, rotor SX47910A, Beckmann Coulter Avanti Centrifuge J-26S XPI, rotor JLA-9.1000, Beckmann Coulter Avanti Centrifuge J30I, rotor JLA-16.250, Beckmann Coulter
EmulsiFlex	EmulsiFlex C3, Avestin
Fotoaparát	E-620, Olympus
Homogenizátor podle Dounceho	PYREX
HPLC systém	AKTA purifier, GE Healthcare Life Sciences
Kolona pro gelovou chromatografii	Superdex 200 10/300 GL, GE Healthcare Life Sciences
Koncentrátor	Amicon Ultra 3 kDa, Millipore Ireland Ltd.
Krystalizační robot	CrystalGryphon, Art Robbins Instruments Oryx8, Douglas Instruments
Magnetická míchačka	ARE, VELP
Mikroskop	SZX10, Olympus
Mikrospektrofotometr	Spectophotometer ND-1000, Nanodrop
pH metr	HI 3220 pH / ORP Meter; HANNA instrument

Předvážky	EMB 500-1, Kern
Rotační inkubátor	Innova 44, New Brunswick
Rotáror	Multi RS-60, Biosan
Termocykler	Professional TRIO Thermocycler, Biometra Product Line
Termostat	IPP 400, Memmert
UV fotoaparát	QUANTUM ST4-1100, Vilbert Lourmat
Vodní lázeň	JB Aqua 2 Plus, Grant
Vortex	Gene 2, Scientific industeries
Zdroj pro vertikální elektroforesu	PowerPac Basic, Bio-Rad

3.2 Materiál a chemikálie

Agarosa	Agarosa SERVA pro DNA elektoforesu, SERVA
Akrylamid, bisakrylamid	Rotiphorese gel 30 (37,5:1), Carl Roth
B-merkaptoethanol	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue G 250	Sigma-Aldrich
EDTA (ethylendiamin tetraoctová kyselina)	Carl Roth
Ethidium bromid	Carl Roth
Kanamycin	Carl Roth
HEPES	Carl Roth
Kyselina mravenčí	Carl Roth
Myo-inositol	Sigma-Aldrich
Ni-NTA agarosa	Protino
Peroxodisíran amonný	Carl Roth
SDS	Carl Roth
Standard pro DNA elektroforesu	Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific

Standard pro proteinovou elektroforesu	PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kDa, Thermo Scientific
TCEP	Thermo Scientific
TEMED	Carl Roth
Tris-Cl	Carl Roth

3.2.1 Roztoky, pufry a média

CBB barvicí roztok	3 mM Coomassie Brilliant Blue R250, 1,5 M CH_3COOH, 50% (V/V) methanol
Eluční pufr pro afinitní chelatační chromatografii	50 mM Tris (pH 8), 300 mM NaCl, 3 mM BME, 300 mM imidazol, 10% (V/V) glycerol
Ligační pufr	5x Rapid Ligation pufr , Thermo Scientific
LB agar podle Lennoxe	P-Lab
LB medium podle Lennoxe	P-Lab
Nanášecí pufr pro DNA elektroforesu	6x DNA Loading Dye, Thermo Scienttific
Nanášecí pufr pro SDS elektroforesu	4x Roti Load®1, Carl Roth
Promývací pufr	50 mM Tris (pH 8), 300 mM NaCl, 3 mM BME, 40 mM imidazol, 10% (V/V) glycerol
Pufr pro gelovou permeační chromatografii	20 mM HEPES (pH 7)
Pufr pro SDS elektroforesu (Tris-glycinový pufr)	25 mM Tris NaCl, 0,25 M glycin, 0,1 % (W/W) SDS, pH 8,8
TBE pufr	89 mM Tris, 89 mM kyselina boritá, 2 mM EDTA, pH 8,3
Sady krystalizačních roztoků	JCSG Core Suite I-IV, Qiagen MORPHEUS, Molecular Dimensions SG1, Molecular Dimensions

Sady pro purifikaci DNA	QIAquick PCR Purification kit ,Qiagen
	QIAprep Spin Miniprep Kit ,Qiagen
Restrikční pufr	10x Fast Digest Green pufr, Thermo Scientific
TAE pufr	40 mM Tris, 20 mM CH_3COOH, 1mM EDTA, pH 8,0
ZY médium	1% (W/V) trypton, 0,5% (W/V) kvasniční extrakt, 2,8 mM glukosa, 6 mM laktosa, 0,5% (V/V) glycerol, 1 mM $MgCl_2$, 25 mM $(NH_4)_2SO_4$, 50 mM KH_2PO_4, 50 mM Na_2HPO_4

4. METODY

4.1 Příprava vektorů pro bakteriální expresi rekombinantních PI-PLC

4.1.1 PCR reakce

DNA pro jednotlivé mutanty *Bc*PI-PLC (H32A, H82A, H82A/W47A, H82A/W242A, H82A/W47A/W242A, W47A/W242A) byla získaná PCR reakcí, pro složení reakční směsi a reakční podmínky viz tab. 4.1.1 a tab. 4.1.2. Použité templátové DNA s již zaklonovanými mutantními formami PI-PLC byly dar dr. Tamase Bally, M.D. Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v tab. 4.1.3.

Tab. 4.1.1: *Složení PCR reakční směsi.*

Složky	Množství
Templátová DNA	2-3,5 ng v 8 µl H_2O
Forwardní primer 10µM	1 µl
Reversní primer 10µM	1 µl
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	10 µl

Tab. 4.1.2: *Program PCR reakce.*

Počet cyklů	Teplota [°C]	Čas [s]
1	98	30
35	98 64 72	10 30 30
1	72	120
1	4	∞

Tab. 4.1.3: *Sekvence primerů použitých při PCR reakci.*

Primer	Sekvence
Forwardní	5’ CAGACCCATGGCCTCTTCAGTGAACGAGCTGGAG 3’
Reversní	5’ GTCTGGCGGCCGCTACTCTTTAATCAGACTCTTGTTGG 3’

Produkty PCR reakcí byly analyzovány za použití horizontální agarosové elektroforesy. 2µl vzorku byly nanášeny společně s 6x koncentrovaným vzorkovým pufrem na 1% agarosový gel obsahující 0,02% ethidium bromid. Dále byly na gel naneseny 2 µl standardu (GeneRuler). Elektroforesa probíhala v TAE pufru 15 minut při napětí 300V. Vzorky DNA byly vizualizovány pomocí UV fotoaparátu QUANTUM ST4-1100. Pro elektroforeogram viz kapitolu 5.1, str. 42.

Pro přečištění produktů PCR reakcí byla použita komerční souprava QIAquick PCR Purification kit.

4.1.2 Restrikční štěpení DNA

Pro možnost vnesení insertu do plasmidu (viz. kap. 4.1.3) byly na obou koncích těchto úseků DNA vytvořeny lepivé konce za použití dvou restrikčních endonukleas. Složení reakční směsi je uvedeno v tab. Reakční směs byla protřepána, odstředěna a inkubována 30 minut při 37°C. Naštěpené produkty byly následně přečištěny pomocí komerční soupravy QIAquick PCR Purification kit.

Tab. 4.1.4: *Reakční směs pro restrikční štěpení DNA*.

Složky	Štěpení plasmidu	Štěpení produktu PCR
DNA	530 ng	2,08 µg
Endonukleasa NcoI	0,5 µl	0,5 µl
Endonukleasa NotI	0,5 µl	0,5 µl
CIAP	0,5 µl	-
Pufr Fast Digest Green	10 µl	10 µl
HPLC H2O	63,5 µl	39 µl

4.1.3 Ligace

Pro vložení insertu (štěpený produkt) do plasmidu byla provedena ligační reakce. Pro lepší rozpustnost následně produkovaného proteinu byl použit vektor pHisGB1 obsahující gen pro imunoglobulinvazebný protein 1 (GB1, z angl. Immunoglobulin Binding Protein). Po přípravě

byla ligační směs, jejíž složení je uvedeno v tab. 4.1.5., promíchána, krátce odstředěna (30 sekund, 13 000 RPM, centrifuga Centrifuge 5418, rotor FA-45-18-11) a inkubována 30 minut za pokojové teploty.

Tab. 4.1.5: *Složení ligační směsi.*

Složky	Množství [µl]
Štěpený produkt PCR	5,5
Štěpený plasmid	0,7
Ligační pufr (5x Rapid Ligation pufr)	3
HPLC H_2O	5,5
T4 DNA ligasa	0,3
Celkový objem	15

4.1.4 Transformace buněk *E.coli DH5α*

60 µl buněčné suspenze chemicky kompetentních buněk *E.coli DH5α* bylo na ledu smícháno s 3 µl ligační směsi. Buňky byly na ledu inkubovány 15 minut a poté vystaveny teplotnímu šoku 42°C po dobu 42s. Po krátké inkubaci na ledu (přibližně 1 minuta) byl k buňkám přidán 1 ml LB media. Po hodinové kultivaci při 37°C byly buňky odstředěny (30 sekund, 13 000 RPM, centrifuga Centrifuge 5418, rotor FA-45-18-11). Většina supernatantu byla odstraněna a ve zbylých 100 µl peleta resuspendována. Buňky byly přeneseny na Petriho misku s LB agarem, obsahujícím 40 µg/ml kanamycinu, a inkubovány přibližně 15 hodin při 37°C.

4.1.5 PCR z kolonií

Pro ověření vložení odpovídající DNA do plasmidu byly provedeny PCR reakce z kolonií. Bylo připraveno 8 reakcí dle tab. 4.1.6, str. 36, do nichž byla špičkou pipety přenesena malá část biomasy různých bakteriálních kolonií (viz kap. 4.1.4). Program PCR reakcí je uveden v tab. 4.1.7, str. 36. K analýze PCR produktů byla použita horizontální agarosová elektroforesa v přítomnosti ethidium bromidu.

Tab. 4.1.6: *Složení reakční směsi pro PCR z kolonií.*

Složky	Množství [µl]
Biomasa z 1 kolonie	-
Forwardní primer T7 10µM	0,5
Revezrní primer NotI 10µM	0,5
Dream Taq Green Master Mix, Thermo Scientific	7,5
HPLC H_2O	6,5

Tab. 4.1.7: *Program pro PCR reakci z kolonií.*

Počet cyklů	Teplota [°C]	Čas [s]
1	94	120
25	94 52 72	60 30 30
1	4	∞

4.1.6 Minipreparace plasmidové DNA

Část biomasy positivních bakterií (bakterií nesoucí plasmid s požadovaným insertem) byla resuspendována v 5 ml LB media s kanamycinem o finální koncentraci 40 µg/ml. Kultura byla inkubována při 37°C přes noc a poté odstředěna (3000 RPM, 10 min., Allegra X-15 R Centrifuge). DNA byla izolována pomocí komerční soupravy QIAprep SpinMiniprep Kit dle návodu výrobce.

4.1.7 Sekvenace

Získaný plasmid byl ověřen pomocí sekvenace metodou Sangerova sekvenování. Pro každý plasmid byly připraveny dvě sekvenační reakce s primery nasedajícími na plasmid těsně před (reakce z forwardního primeru GB1 seq) a těsně za insertem (reakce z reversního primeru DuetDown). Do každé reakce bylo přidáno 500 ng DNA, 2,5 µl 10mM primeru a voda do celkového objemu reakce 10 µl. Sekvenace byla provedena firmou GATC Biotech.

4.1.8 Cílená mutagenese

Mutace H32K a H82A/Y88A byly do konstruktu vneseny pomocí PCR reakce za použití primerů uvedených v tab. 4.1.10. Program a složení PCR reakce jsou uvedeny v tab. 4.1.8 a tab. 4.1.9. Forwardní primer obsahoval triplet pro požadovanou mutaci, reversní nesl na 5' konci fosfát, pro možnost zacyklení linearizovaného plasmidu. Temlátovou DNA pro H32K byl mutant H32A, pro H82A/Y88A mutant H82A, jejich získání je popsáno v kap. 4.1, str. 33.

Tab. 4.1.8: *Složení PCR reakce pro cílenou mutagenesi.*

Složky	Množství
Templátová DNA	0,5 ng
Forwardní primer 10μM	1 μl
Reversní primer 10μM	1 μl
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	10 μl

Tab. 4.1.9: *Reakční podmínky PCR reakce pro cílenou mutagenesi.*

Počet cyklů	Teplota [°C]	Čas [s]
1	98	30
35	98 67 72	10 30 30
1	72	120
1	4	∞

Tab. 4.1.10: *Sekvence primerů použitých při mutagenesi.*

Primer		Sekvence
H32K	Forwardní	5' GATAGCGGAACCTTCAAGCTTCA 3'
	Reversní	5' PGGTTCCCGGTATGCTAATGC 3'
H82A/Y88A	Forwardní	5' GCG CTGTATGTTACGCTGCACGAGTTCATC 3'
	Reversní	5' PCAGTGGCCCGTGGTGCAGTA 3'

Velikost PCR produktů byla zkontrolována pomocí horizontální agarosové elektroforesy. Konce linearizovaného vektoru byly spojeny ligací (složení ligační směsi je uvedeno v tab. 4.1.11).

Tab. 4.1.11: *Složení ligační směsi*.

Složky	Množství (µl)
Linearizovaný plasmid	5,5
Ligační pufr (5x Rapid Ligation pufr)	3
HPLC H_2O	5,7
T4 DNA ligasa	0,3
Celkový objem	15

Výsledným plasmidem byly transformovány bakterie *E.coli DH5α*. Další postup byl shodný s postupem uvedeným v kap. 4.1, str. 33.

4.2 Exprese a purifikace PI-PLC

Jelikož byly při expresi a purifikaci jednotlivých mutantů PI-PLC použity stejné postupy, bude v následujících odstavcích popsán pouze případ mutantu H32A.

4.2.1 Bakteriální exprese

Pro bakteriální expresi mutantních forem PI-PLC byly chemicky kompetentní buňky *E.coli BL21* star transformovány vektory, jejichž příprava je popsána výše. Bylo postupováno stejně jako v případě transformace buněk *E.coli DH5α.* Po teplotním šoku byly buňky přeneseny na Petriho misku a inkubovány přes noc při 37°C. Poté bylo vždy z jedné kolonie přenesena část biomasy do 5 ml LB media s kanamycinem o finální koncentraci 40 µg/ml. Buňky byly inkubovány přes noc při 37°C a 220 RPM. Takto připraveným inokulem byly zaočkovány 3 l ZY media s kanamycinem o finální koncentraci 40 µg/ml. Kultivace probíhala při 37°C do OD přibližně 0,8, poté byla teplota snížena na 18°C a buňky inkubovány dalších 12 hodin.

4.2.2 Izolace proteinu

4.2.2.1 Zpracování bakteriální kultury

Bakteriální kultura získaná dle kap. 4.2.1, str. 38, byla odstředěna (10 minut při 6000 RPM a 4°C v centrifuze Beckmann Coulter Avanti J-26S XPI, rotor JLA-9.1000). Peleta byla resuspendována v přibližně 100 ml promývacího pufru (složení viz. kap. 3.2.1, str. 31) a následně homogenizována na ledu v homogenizátoru dle Dounceho. Buňky byly lyzovány za použití EmulsiFlexu C3 za tlaku v rozmezí 110-120 MPa. Získaný lyzát byl následně odstředěn na centrifuze Beckmann Coulter Avanti Centrifuge J30I při 40 000 RCF.

4.2.2.2 Afinitní chelatační chromatografie

3 ml Ni-NTA agarosy byly po promytí vodou ekvilibrovány v promývacím pufru, jehož složení je uvedeno v kap. 3.2.1, str. 31, a přidány k supernatantu (kap. 4.2.2.1). Pro navázání hexahistidinové kotvy proteinu na nikelnaté ioty byla agarosa inkubována se supernatantem 30 minut při 5 °C za stálého míchání na rotátoru Multi RS - 60 BIOSAN. Po inkubaci byla agarosa promyta. Promytí zahrnovalo 5 cyklů centrifugace (centrifuga Beckmann Coulter Allegra X-15R, 1 minuta, 1620 RPM), odstranění supernatantu a přidání přibližně 50 ml promývacího pufru. Poté byl nosič agarosy přenesen na 15 ml kolonku a protein byl eluován 10 ml elučního pufru s vysokou koncentrací imidazolu (pro složení pufru viz kap. 3.2.1, str. 31) po 1 ml frakcích. Frakce byly analyzovány pomocí diskontinuální elektroforesy v prostředí SDS (viz kap. 4.2.2.3). Frakce, kde byl protein přítomen, byly spojeny. K roztoku proteinu byla přidána EDTA na finální 3 mM koncetraci.

4.2.2.3 Diskontinuální elektroforesa v prostředí SDS (SDS-PAGE)

Vzorky pro elektroforetickou analýzu proteinu byly připraveny smícháním 6x koncentrovaného nanášecího pufru s 8-15 µl roztoku proteinu (v závislosti na jeho koncentraci) a 5 minutovou inkubací při 95°C v blokové lázni. Vzorky a 2 µl standardu (Page ruler) byly naneseny na 15% polyakrylamidový gel. Separace probíhala ve vertikálním uspořádání 60 minut při napětí 160 V. Složení elektroforetického pufru je uvedeno v kap. 3.2.1, str. 31. Gel byl pro vizualizaci rozdělených proteinů barven přibližně 30 minut v roztoku CBB (Comassie Brilliant Blue), pro složení viz kap. 3.2.1, str. 31.

4.2.2.4 Štěpení TEV proteasou

Pro odštěpení His-GB1 kotvy bylo k roztoku proteinu získaného dle kap. 4.2.2.2, str. 39, přidáno 200µl TEV proteasy o koncentraci 2mg/ml a β-merkaptoethanol na finální koncentraci 5 mM. Inkubace probíhala při 4°C přibližně 38 hodin. Průběh štěpení byl kontrolován pomocí elektroforesy (viz kap. 4.2.2.3, str. 39).

4.2.2.5 Koncentrování proteinu

Roztok proteinu byl zakoncentrován na požadovaný objem centrifugací v koncentrátoru AmiconUltra 3K (Beckmann Coultier – Allegra X-15 R, 3000 RPM). Koncentrace probíhala v několika cyklech (v závisloti na koncentraci proteinu) po 15 minutách.

4.2.3 Purifikace proteinů

4.2.3.1 Gelová permeační chromatografie

Vzhledem k velikosti proteinu (35kDa) byla pro gelovou permeční chromatografii použita kolona s dělícími schopnostmi do 75kDa (Superdex75 GL300/10). Po nanesení vzorku na kolonu ekvilibrovanou pufrem pro gelovou permeační chromatografii (složení viz kap. 3.2.1, str. 31) byl protein eluován přibližně 130 ml téhož pufru. Chromatografie probíhala na purifikačním systému ÄKTA purifier 10. Frakce byly automaticky sbírány po 1,5 ml. Frakce, jejichž spekrofotometrický profil měřený při 254 a 280 nm odpovídal přítomnosti proteinu, byly elektroforeticky analyzovány. Protein byl zakoncentrován na 10 mg/ml a dále uchováván při -80 °C.

4.3 Proteinová krystalografie

4.3.1 Krystalizace PI-PLC

300 µl roztoků proteinů (H32A, H32K, H82A/W47A) o koncentraci 9-10,8 mg/ml (viz tab. 4.3.1, str. 41) bylo smícháno s *myo*-inositolem na finální koncentraci 10 respektive 100 mM.

Tab 4.3.1: *Koncentrace proteinů použitých pro krystalizaci komplexu s myo-inositolem.*

	H32A	H32K	H82A/W47A
Koncentrace (mg/ml)	9,5	10,8	8,9

Ke komplexům bylo přidáno redukční činidlo TCEP o finální koncentraci 3 mM. Pro krystalizaci komplexů byly použity komerční sady krystalizačních roztoků (tzv. screeny) cryo-JCSG Core Suite I-IV, MORPHEUS a SG1. Sady cryo JCSG Core Suite byly připraveny smícháním roztoků JCSG Core Suite s glycerolem v poměru 4:1. Krystalizace probíhala metodou difuze par v uspořádání sedící kapky v 96 jamkových krystalizačních destičkách Intelli-plate při 18°C. Sedící kapky byly získány smícháním 0,5 µl komplexu s 0,5 µl krystalizačních roztoků za použití krystalizačního robota CrystalGryphon nebo Oryx. Difuse probíhala proti 70 µl krystalizačního roztoku v reservoáru, odchodu par bylo zabráněno přelepením destiček průhlednou fólií. Proces krystalizace byl pozorován na světelném mikroskopu Olympus SZX10. Krystaly byly zamraženy v kapalném dusíku.

4.3.2 Měření difrakce

Difrakce krystalů byly měřeny v synchrotonu BESSY. Vlnová délka záření při měření krystalů komplexů H32A, H32K i W47A/H82A byla 0,9184 Å. Pro snížení radiačního poškození byly krystaly při měření chlazeny na teplotu 100K.

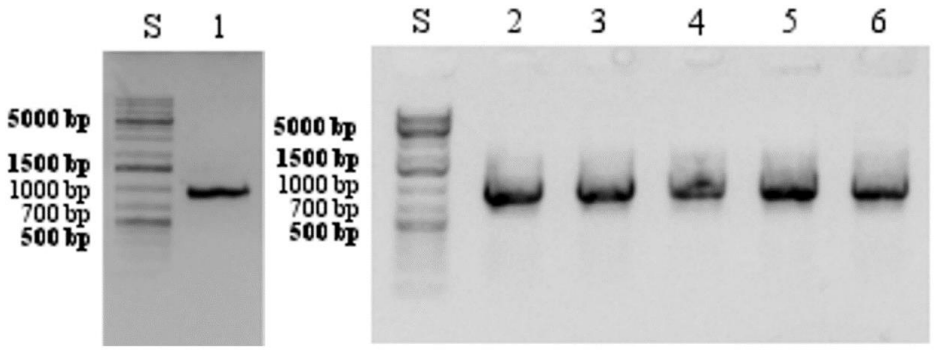
4.3.3 Vytvoření modelu

Získaná data byla integrována v programu XDS. Fázový problém byl řešen metodou molekulárního nahrazení za použití programu Phaser, jako model byla použita struktura komplexu PI-PLC s *myo*-inositolem (PDB identifikační kód 1GYM). Stavba modelu a následný proces tzv. „refinementu“ probíhaly v balíčku programu Phenix. Pro manuální refinement byl využit software Coot. Následně byl model graficky zpracován v programu Pymol.

5. VÝSLEDKY

5.1 Příprava vektoru pro bakterální expresi mutantních forem PI-PLC

Geny pro mutanty (H32A, H82A, H82A/W47A, H82A/W242A, H82A/W47A/W242A, W47A/W242A) byly získány PCR reakcí z plasmidů již obsahujících požadované mutace. Templátová DNA byl dar dr. Tamase Bally. Při PCR reakci byly do sekvencí pro PI-PLC vloženy restrikční místa pro endonukleasy NcoI a NotI. Elektroforetická pohyblivost produktů PCR reakcí odpovídala velikosti genu pro PI-PLC (900 bp), viz obr. 5.1.1.

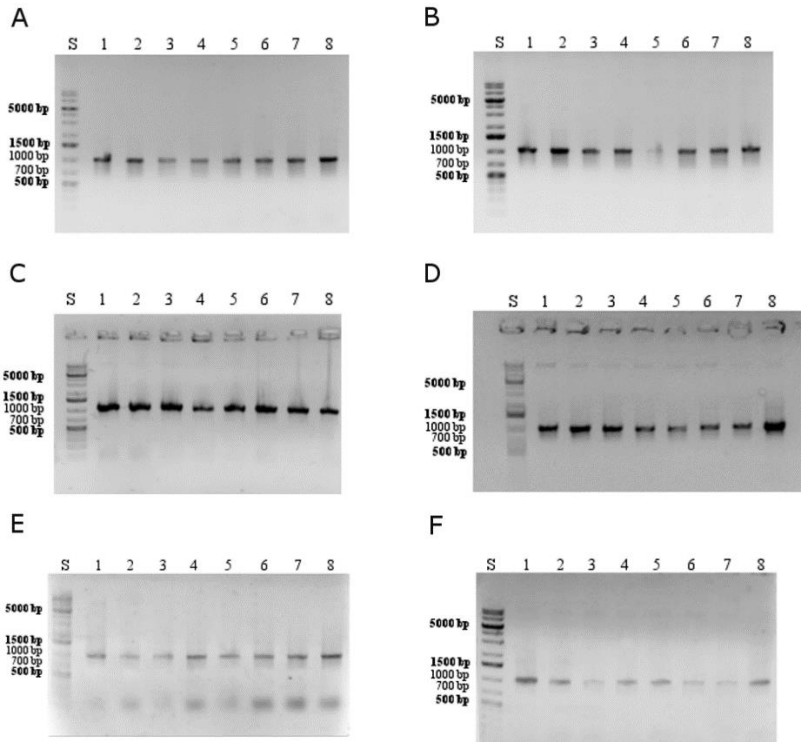


Obr. 5.1.1: *Elektroforesa amplifikovaných genů v 1% agarosovém gelu.* S – standard, 1 – H32A, 2 – H82A, 3 – H82A/W47A, 4 – H82A/W242A, 5 – H82A/W47A/W242A, 6 – W47A/W242A.

Konstrukty byly následně štěpeny restrikčními endonukleasami a vloženy do plasmidu pHisGB1. Tento vektor obsahuje vedle sekvence pro štěpné místo pro TEV proteasu a resistence na kanamycin i sekvenci kódující hexahistidinovou kotvu fůzovanou s GB1 proteinem, který zajišťuje lepší rozpusnost proteinu. Navržený konstrukt je znázorněn na obr. 5.1.2.

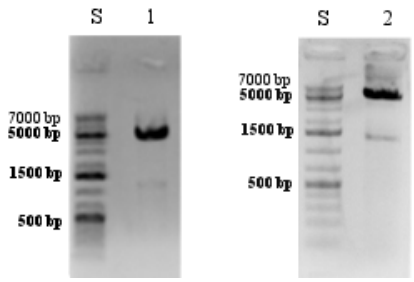
Obr. 5.1.2: *Schématické znázornění konstruktu pro PI-PLC*. Konstrukty pro mutanty PI-PLC obsahovaly na N-konci hexahistidinovou kotvu fůzovanou se solubilizačním faktorem GB1 a sekvenci pro štěpné místo pro TEV proteasu pro odstranění kotvy. His – hexahistidinová kotva, GB1 – pHisGB1 obsahující gen pro imunoglobulinvazebný protein 1, TEV – štěpné místo TEV proteasy.

Připravenými vektory byly transformovány *E.coli DH5α* a z kolonií vyrostlých na agarové misce provedeny PCR reakce. Elektroforetický profil produktů odpovídal velikosti genů pro PI-PLC (obr. 5.1.3). Vektory z pozitivních kolonií byly amplifikovány v *E.coliDH5α* a ověřeny sekvenací.

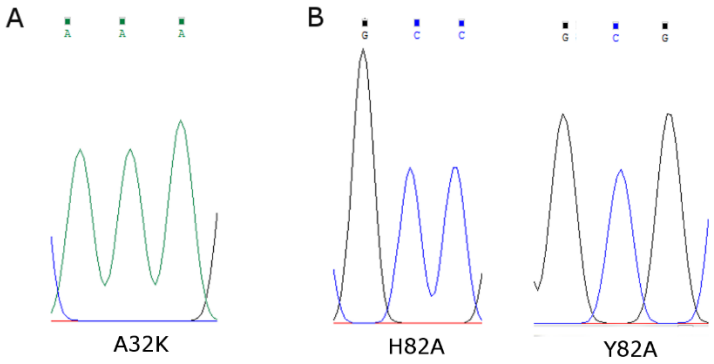


Obr. 5.1.3: *Elektroforesa produktů PCR z kolonií v 1% agarosovém gelu.* S – standard, 1-8 – kolonie bakterií transformovaných vektory pro: A) H32A, B) H82A C) H82A/W47A, D) H82A/W242A, E) H82A/W47A/W242A, F) W47A/W242A.

Konstrukty pro H32K a H82A/Y88A byly získány cílenou mutagenezí za použití PCR reakce, jejíž produkty jsou znázorněny na obr. 5.1.4, str. 44. Při použití této metody dochází k amplifikaci celého vektoru, přičemž je do genu zanesena požadovaná mutace. Linearizovaný plasmid byl zacyklen ligací a transformován do *E.coliDH5α*. Vektor byl amplifikován v a následně sekvenován. Výsledek sekvenace je znázorněn na obr 5.1.5, str. 44.



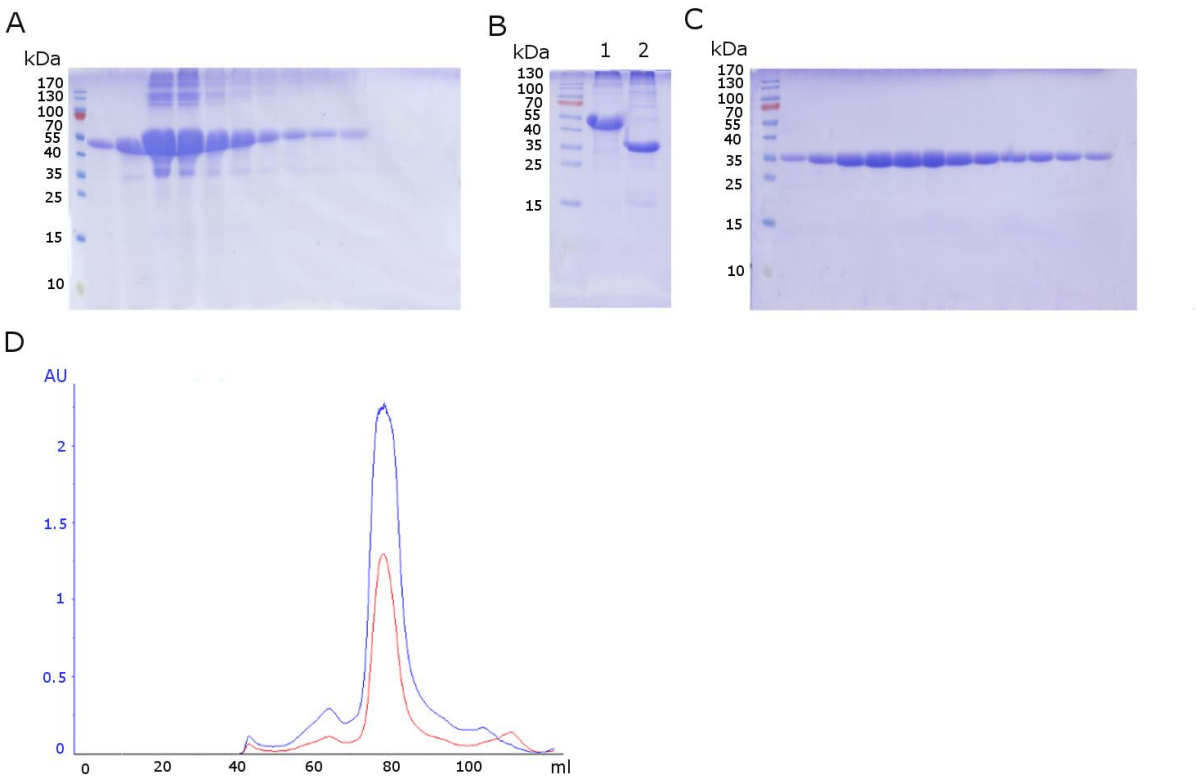
Obr. 5.1.4: *Elektroforesa produktů PCR reakce pro cílenou mutagenesi.* S – standard, 1 – mutace A32H, B – mutace H82A/Y88.



Obr. 5.1.5: *Výsledky sekvenací expresních vektorů pro A) mutant A32K, B) H82A/Y88A.*

5.2 Exprese a purifikace PI-PLC

Vektory pro mutanty (H32A, H32K, H82A, H82A/W47A, H82A/W242A, H82A/W47A/W242A) byly transformací vloženy do *E.coli BL21star* a proteiny byly exprimovány v 3 l autoindukčního media. Proteiny byly z bakteriálního lyzátu izolovány pomocí afinitní chelatační chromatografie a His-GB1 kotva následně odštěpena pomocí TEV proteasy, viz obr. 5.1.6, str. 45. Dále byly přečištěny pomocí gelové permeační chromatografie, pro chromatogramy a elektroforetické profily frakcí s nejvyšší absorbancí viz obr. 5.1.6, str. 45. Protože byly výstupy purifikací mutantů téměř totožné, jsou výsledky ilustrovány na příkladu izolace a purifikace A32H.



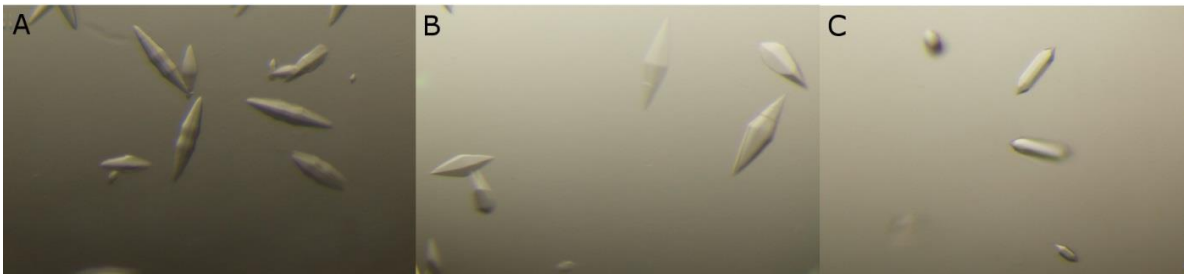
Obr. 5.1.6. *Purifikace PI-PLC A32H.* A) Elektroforetická pohyblivost frakcí při afinitní chromatografii. B) Štěpení His-GB1 kotvy TEV proteasou. 1 – neštěpený protein, 2 – štěpený protein. C) Eluční profil při gelové permeační chromatografii. D) chromatogram pro dělení proteinu pomocí gelové permeační chromatografie.

5.3 Proteinová krystalografie

Krystalizace komplexů *Bc*PI-PLC H32A, H32K a H82A/W242A s *myo*-inositolem probíhala metodou difuze par v uspořádání sedící kapky za použití sad komerčních krysalizačních roztoků, viz. kap. 3.2.1, str. 31. Krystaly (obr. 5.1.7, str. 46) vyrostly během tří dnů a vykazovaly dostatečnou kvalitu a velikost pro měření difrakce rentgenového záření. Podmínky, v nichž se vytvořily měřené krystaly, jsou uvedeny v tab. 5.1, str. 46.

Tab. 5.1: *Krystalizační podmínky měřených krystalů.*

Mutant	Sůl	Pufr	Precipitant	Kryoprotektant
H32A	0,05M LiSO4	0,1M Tris pH 7,0	50% (v/v) PEG 200	20% glycerol
H32K	0,2M Ca(CH3COO)2	0,1M Tris pH 7,0	20% (w/v) PEG 3000	
H82A/W47A	0,2M KI	-	20% (w/v) PEG 3350	



Obr. 5.1.7: *Krystaly BcPI-PLC v komplexu s myo-inositolem.* A) mutant H32A, B) mutant H32H, C) mutant W47A/H82A.

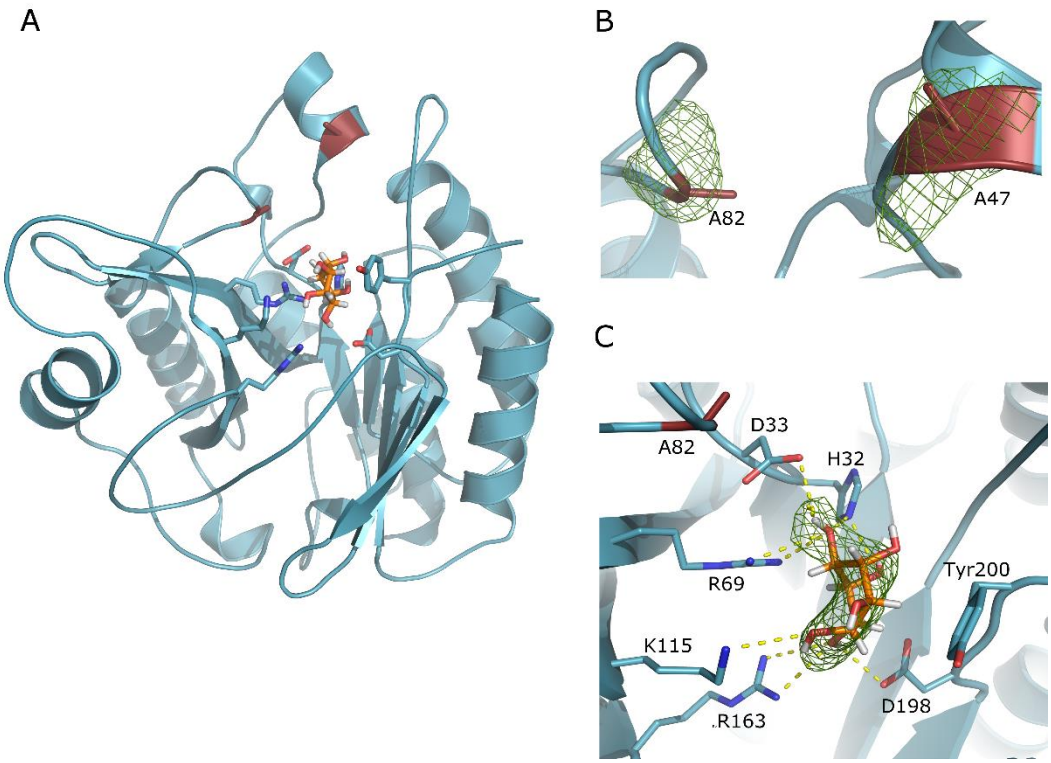
Pro zpracování dat byly použity programy XDS, Phenix a Coot, fázový problém byl řešen metodou molekulárního nahrazení. Statistiky pro modely struktur komplexů jsou uvedeny v tab. 5.2, str. 47.

Tab. 5.2: *Statistika sběru dat a vyhodnocení modelů stuktur komplexů mutantů PI-PLC s myo-inositolem.*

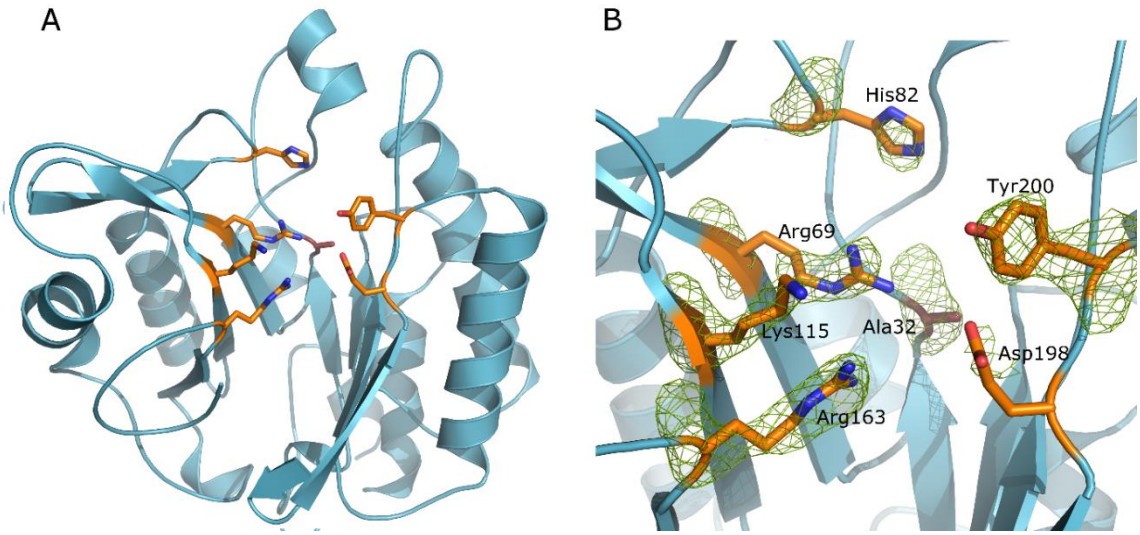
	PI-PLC H82A/W47A	**PI-PLC H32A**	**PI-PLC H32K**
Vlnová délka záření (Å)	0,9184	0,9184	0,9184
Rozpětí rozlišení (Å)	48,11-2,5 (2,589-2,5)	48,99-2,699 (2,796-2,699)	31,6-3,267 (3,384-3,267)
Prostorová grupa	P 63 2 2	P 63 2 2	P 63 2 2
Rozměry elementární buňky	a=129,839 Å, b=129,839 Å, c=214,946 Å, α=β=90, γ=120	a=130,226 b=130,226 c=217,605 α=β=90, γ=120	a=131,574 Å b=131,574 Å c=212,545 Å α=β=90, γ=120
Počet celkových reflexí	573842 (58697)	132617 (11822)	339200 (35307)
Počet jedinečných reflexí	37723 (3672)	30465 (2948)	32248 (3192)
Multiplicita	15,2 (16,0)	4,4 (4,0)	10,5 (10,9)
Kompletnost (%)	99,84 (99,95)	99,02 (98,50)	99,36 (98,52)
I/sigma(I)	9,32 (0,90)	3,65 (1,11)	13,62 (2,34)
R-merge (%)	30,9 (286,2)	38,2 (111,1)	15,82 (96,96)
R-work (%)	24,91	22,21	27,15
R-free (%)	28,38	27,66	32,34
Počet nevodíkových atomů	7186	7601	13557
Počet zbytků proteinu	880	7190	1765
Počet zbytků ligandu	8	15	8
RMS (vazby)	0,004	0,003	0.003
RMS (úhly)	0,67	0,64	0.69
Ramachandran (zakázané/přednostně zaujímané)	0,57/93,56	0,00/95,67	0,51/93,66
Průměrný B-faktor	23,78	21,33	85,67
Makromolekuly	47,30	21,30	85,68
Ligandu	69,65	30,00	74,86
Solventu	60,02	21,52	

V závorkách jsou uvedeny hodnoty pro slupku s nejvyšším rozlišením.

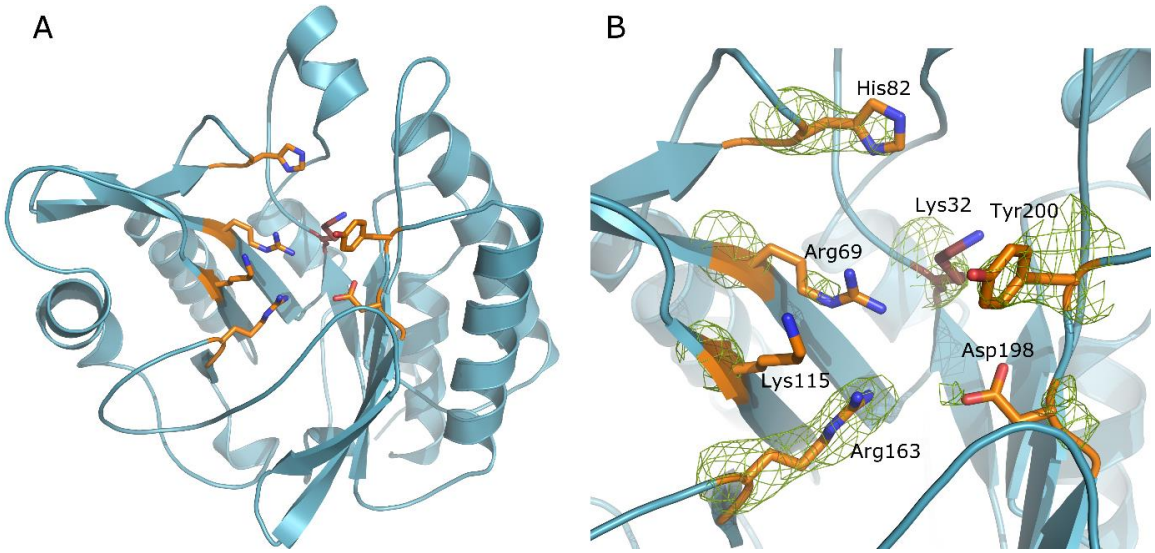
Celková struktura všech modelů odpovídala struktuře wtPI-PLC (z angl. wild type) – PI-PLC H32A, H32K i H82A/W47A zaujímají strukturu neúplného TIM barelu, viz obr. 5.1.8, obr. 5.1.9, str. 49 a obr. 5.1.10, str. 49. V této struktuře se pravidelně střídají α-helixy s β-skládanými listy, které vytvářejí barel. Jeden z helixů je nahrazen β-skládaným listem.



Obr. 5.1.8: *Struktura BcPI-PLC W47A/H32A*. Mutované aminokyseliny (A82, A47) znázorněny tmavě červeně, oranžově molekula *myo*-inositolu, oranžově molekula *myo*-inositolu, zeleně znázorněna diferenciální mapa elektronové hustoty konturovaná při 3σ. A) Celkový pohled. B) Elektronová densita pro A82 a A47. C) Interakce mutantu s *myo*-inositolem. Žlutě zobrazeny vodíkové vazby.



Obr. 5.1.9: *Model Struktury mutantu H32A.* A) Celkový pohled. B) Detailní pohled na vazebné místo pro *myo*-inositol. Oranžově znázorněny aminokyseliny vázající *myo*-inositol ve wtPI-PLC, hnědě mutovaná aminokyselina A32, zeleně znázorněna diferenciální mapa elektronové hustoty konturovaná při 3σ.



Obr. 5.1.10: *Model struktury mutantu H32K.* A) Celkový pohled. B) Detailní pohled na vazebné místo pro *myo*-inositol. Oranžově znázorněny aminokyseliny vázající *myo*-inositol ve wtPI-PLC, hnědě mutovaná aminokyselina K32, zeleně znázorněna diferenciální mapa elektronové hustoty konturovaná při 3σ.

V modelu pro H82A/W47A nemají mutace vliv na vazbu *myo*-inositolu. Ten je vázán vodíkovými vazbami s postranními řetězci H32, R69, K115, R163, D198 a patrovými interakcemi s Y200. *Myo*-inositol vytváří vodíkové vazby i s D33, tato vazba nebyla pozorována ve wtPI-PLC, viz kap. 1.3.2, str. 22.

Prvotní modely pro H32A a H32K neobsahovaly *myo*-inositol. Proto byly komplexy krystalizovány znovu za použití vyšší koncentrace *myo*-inositolu (100 mM). Ani v tomto případě nebyl *myo*-inositol v modelu přítomen, viz obr. 5.1.9B a 5.1.10B, str. 49.

7. DISKUZE

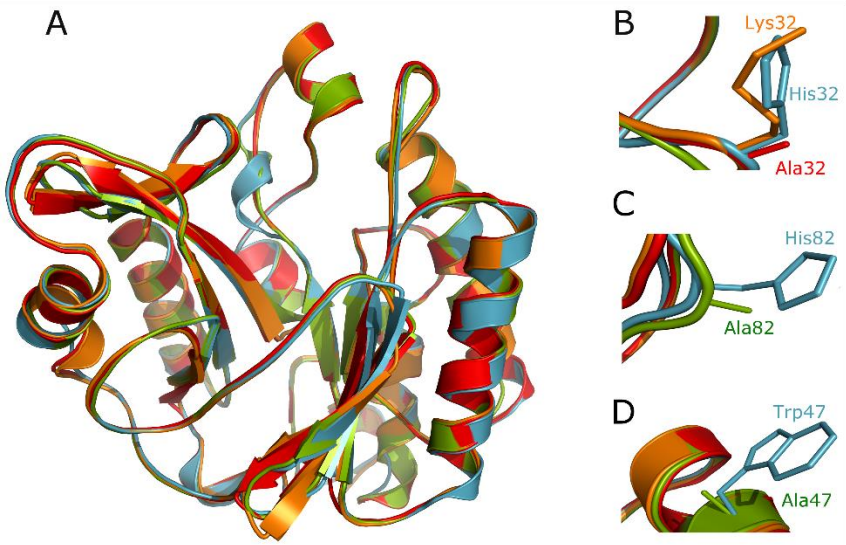
Fosfatidylinositol je prekursorem pro řadu významných signálních molekul, jeho prostorová a časová dynamika však zůstává nevyjasněna. Proto v kooperaci s laboratoří dr. Tamase Bally vyvíjíme biosenzor pro PI. Biosenzor obecně musí mít vysokou afinitu a specifitu pro substrát, ale nesmí být katalyticky aktivní. Z tohoto důvodu jsme navrhli několik mutantních forem PI-PLC z *Bacillus cereus*. Tyto formy obsahovaly bodové mutace aminokyselin klíčových pro katalytickou aktivitu PI-PLC (H32, H82) nebo její nespecifickou vazbu na membránu (W47,W242, Y88).

Tyto mutantní formy byly v dostatečných výtěžcích rekombinantně exprimovány v bakteriálním expresním systému *E.coli* a krystalizovány v komplexu s *myo*-inositolem. Měření difrakce krystalů poskytovalo rozlišení 2,5 Å (H82A/W47A), 2,7 Å (H32A) a 3.7 Å (H32K). Rozlišení pro H32K je poměrně nízké, stavba modelu tak byla obtížnější než u ostatních mutantů, čemuž odpovídají i hodnoty statistické analýzy.

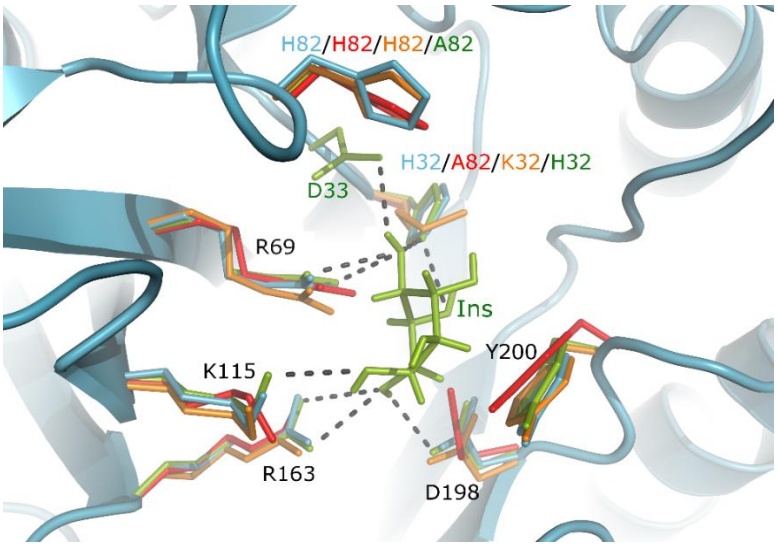
Mutace neovlivňují celkovou strukturu PI-PLC, viz obr. 7.1, str. 52. Modely struktur všech mutantních forem vykazují vysokou podobnost. Nejvíce se od wtPI-PLC odlišuje model struktury PI-PLC H32A - hodnota RMSD dosahuje 0,630 Å. Až na místa mutací zůstává zachována i konformace aktivního místa, viz obr. 7.2, str. 52.

Mutace W47A/H82A neměla vliv na vazbu *myo*-inositolu. Ten je v aktivním místě enzymu držen interakcemi s H32, R69, K115, R163, D198 a Y200, jak již bylo popsáno u dostupných struktur wtPI-PLC v komplexu s *myo*-inositolem (kap. 1.3.2, str. 22). V modelu PI-PLC však navíc vytváří vodíkovou vazbu i s D33.

Ve strukturách forem PI-PLC obsahující mutaci v H32 nebyl *myo*-inositol přítomen. Jak je vidět na obr. 1.3.4, str. 22, H32 vytváří vodíkovou vazbu s 2’ OH skupinou *myo*-inositolu. V mutantech H32 je tato vazba ztracena, a přestože 2’ OH skupina *myo*-inositolu interaguje i s R69, mohla by tato skutečnost mít za následek nedostatečně silnou interakci pro udržení *myo*-inositolu v aktivním místě.



Obr. 7.1: *Strukturní porovnání mutantních forem s wtPI-PLC.* Modře znázorněna wtPI-PLC (identifikační PDB kód 1GYM), zeleně W47A/H82A, oranžově H32K, červeně H32A. A) Celkové porovnání struktur. Nejvíce se od PI-PLC odlišuje struktura mutantu H32A (RMSD 0,630 Å) B) Bodová mutace H32A a H32K. C) Bodová mutace H82A. D) Mutace W47A.



Obr. 7.2: *Strukturní porovnání vazebného místa mutantů a wtPI-PLC.* Modře znázorněna wtPI-PLC (identifikační PDB kód 1GYM), zeleně W47A/H82A, oranžově H32K, červeně H32A. Černě popsány aminokyseliny společné všem formám. Molekula inositolu je vázána PI-PLC W47A/H82A.

Tyto výsledky naznačují, že interakce H32 je pro vazbu *myo*-inositolu klíčová a že formy PI-PLC s mutací v H32 nejsou pro konstrukci biosenzoru vhodné. Pro jejich další charakterizaci a potvrzení této domněnky je nutná krystalizace s rozpustnou formou fosfatidylinositolu a analýza jejich vazby na membránu, což bude součástí navazující disertační práce.

8. ZÁVĚR

Cíle diplomové práce byly splněny jen částečně. Byly připraveny expresní vektory pro mutanty PI-PLC z *Bacillus cereus* (H32A, H32K, H82A, H82A/W47A, H82A/W242A, H82A/W47A/W242A, W47A/W242A, H82A/Y88A). Mutantní formy H82A, H82A/W47A, H82A/W242A, H82A/W47A/W242A byly exprimovány v *E.coli* a purifikovány pomocí afinitní chelatační a gelové permeační chromatografie. Pro získání modelů struktur komplexů byly krystalizovány s *myo*-inositolem a podrobeny rentgenostrukturní analýze. Takto byl získán model struktury komplexu H82A/W47A s *myo*-inositolem. Difrakční data komplexů H32A a H32K však ukázala, že *myo*-inositol není navázán.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

(1) KUKSIS, A.: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier, Amsterdam (2003)

(2) VANCE, D. E., VANCE, J. E.: *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. Elsevier, Amsterdam ; London (2008)

(3) GASCARD, P., TRAN, D., SAUVAGE, M., SULPICE, J. C., FUKAMI, K., TAKENAWA, T., CLARET, M., GIRAUD, F.: Biochim. Biophys. Acta 1069, 27-36 (1991)

(4) VANCE, D. E., VANCE, J. E.: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier, San Diego (2008)

(5) BALLA, T.: Physiol. Rev. 93, 1019-137 (2013)

(6) MAJUMDER, A. L., BISWAS, B. B.: *Biology of Inositols and Phosphoinositides: Subcellular Biochemistry*. Springer US, Boston (2006)

(7) PAK, Y., LARNER, J.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 184, 1042-7 (1992)

(8) MATO, J. M., KELLY, K. L., ABLER, A., JARETT, L., CORKEY, B. E., CASHEL, J. A., ZOPF, D.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 146, 764-70 (1987)

(9) NARASIMHAN, B., PLISKA-MATYSHAK, G., KINNARD, R., CARSTENSEN, S., RITTER, M. A., VON WEYMARN, L., MURTHY, P.: Plant Physiol. 113, 1385-93 (1997)

(10) YEAGLE, P. L.: *The Membranes of Cells*. Academic Press, Boston (2016)

(11) COCKCROFT, S., GARNER, K.: Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 46, 89-117 (2011)

(12) DENNIS, E. A.: J. Lipid Res. 56, 1245-7 (2015)

(13) MCCREA, H. J., DE CAMILLI, P.: Physiology (Bethesda) 24, 8-16 (2009)

(14) FRUMAN, D. A., MEYERS, R. E., CANTLEY, L. C.: Annu. Rev. Biochem. 67, 481-507 (1998)

(15) FALKENBURGER, B. H., JENSEN, J. B., DICKSON, E. J., SUH, B. C., HILLE, B.: J Physiol. 588, 3179-85 (2010)

(16) BALLA, T., WYMANN, M., YORK, J. D.: *Phosphoinositides II: the diverse biological functions*. Springer Netherlands, Dordrecht (2012)

(17) POCCIA, D., LARIJANI, B.: Biochem. J. 418, 233-46 (2009)

(18) BILLCLIFF, P. G., LOWE, M.: Biochem. J. 461, 159-75 (2014)

(19) RUSTEN, T. E., STENMARK, H.: Nat. Methods 3, 251-8 (2006)

(20) BALLA, T.: J Physiol. 582, 927-37 (2007)

(21) NEWMAN, R. H., NI, Q., ZHANG, J.: *Fluorescent Protein-Based Biosensors: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ (2014)

(22) OLDACH, L., ZHANG, J.: Chem. Biol. 21, 186-97 (2014)

(23) VARNAI, P., BALLA, T.: : Biochim. Biophys. Acta 1761, 957-67 (2006)

(24) VARNAI, P., BALLA, T.: Pflugers Arch. 455, 69-82 (2007)

(25) KATAN, M.: Biochim. Biophys. Acta 1436, 5-17 (1998)

(26) DAUGHERTY, S., LOW, M. G.: Infect. Immun. 61, 5078-89 (1993)

(27) GRIFFITH, O. H., RYAN, M.: Biochim. Biophys. Acta 1441, 237-54 (1999)

(28) BROWN, D., WANECK, G. L.: J. Am. Soc. Nephrol. 3, 895-906 (1992)

(29) MARQUES, M. B., WELLER, P. F., PARSONNET, J., RANSIL, B. J., NICHOLSON-WELLER, A.: J. Clin. Microbiol. 27, 2451-4 (1989)

(30) CAMILLI, A., GOLDFINE, H., PORTNOY, D. A.: J. Exp. Med. 173, 751-4 (1991)

(31) MENGAUD, J., BRAUN-BRETON, C., COSSART, P.: Mol. Microbiol. 5, 367-72 (1991)

(32) IKEZAWA, H.: Cell Biol. Int. Rep. 15, 1115-31 (1991)

(33) HEINZ, D. W., RYAN, M., BULLOCK, T. L., GRIFFITH, O. H.: EMBO J. 14, 3855-63 (1995)

(34) MOSER, J., GERSTEL, B., MEYER, J. E., CHAKRABORTY, T., WEHLAND, J., HEINZ, D. W.: J. Mol. Biol. 273, 269-82 (1997)

(35) GOLDSTEIN, R., CHENG, J., STEC, B., ROBERTS, M. F.: Biochemistry 51, 2579-87 (2012)

(36) ESSEN, L. O., PERISIC, O., CHEUNG, R., KATAN, M., WILLIAMS, R. L.: Nature 380, 595-602 (1996)

(37) HEINZ, D. W., RYAN, M., SMITH, M. P., WEAVER, L. H., KEANA, J. F., GRIFFITH, O. H.: Biochemistry 35, 9496-504 (1996)

(38) GASSLER, C. S., RYAN, M., LIU, T., GRIFFITH, O. H., HEINZ, D. W.: Biochemistry 36, 12802-13 (1997)

(39) HONDAL, R. J., ZHAO, Z., KRAVCHUK, A. V., LIAO, H., RIDDLE, S. R., YUE, X., BRUZIK, K. S., TSAI, M. D.: Biochemistry 37, 4568-80 (1998)

(40) HEINZ, D. W., ESSEN, L. O., WILLIAMS, R. L.: J. Mol. Biol. 275, 635-50 (1998)

(41) BRUZIK, K. S., MOROCHO, A. M., JHON, D. Y., RHEE, S. G., TSAI, M. D.: Biochemistry 31, 5183-93 (1992)

(42) LEWIS, K. A., GARIGAPATI, V. R., ZHOU, C., ROBERTS, M. F.: Biochemistry 32, 8836-41 (1993)

(43) BRUZIK, K. S., TSAI, M. D.: Bioorg. Med. Chem. 2, 49-72 (1994)

(44) VOLWERK, J. J., SHASHIDHAR, M. S., KUPPE, A., GRIFFITH, O. H.: Biochemistry 29, 8056-62 (1990)

(45) BRUZIK, K. S., HAKEEM, A. A., TSAI, M. D.: Biochemistry 33, 8367-74 (1994)

(46) SHASHIDHAR, M. S., KEANA, J. F., VOLWERK, J. J., GRIFFITH, O. H.: Chem. Phys. Lipids. 53, 103-13 (1990)

(47) SHASHIDHAR, M. S., VOLWERK, J. J., KEANA, J. F., GRIFFITH, O. H.: Anal. Biochem. 198, 10-4 (1991)

(48) GUTHER, M. L., DE ALMEIDA, M. L., ROSENBERRY, T. L., FERGUSON, M. A.: Anal. Biochem. 219, 249-55 (1994)

(49) LIU, T., RYAN, M., DAHLQUIST, F. W., GRIFFITH, O. H.: Protein Sci. 6, 1937-44 (1997)

(50) KUBIAK, R. J., YUE, X., HONDAL, R. J., MIHAI, C., TSAI, M. D., BRUZIK, K. S.: Biochemistry 40, 5422-32 (2001)

(51) VOLWERK, J. J., FILTHUTH, E., GRIFFITH, O. H., JAIN, M. K.: Biochemistry 33, 3464-74 (1994)

(52) REIS, P., HOLMBERG, K., WATZKE, H., LESER, M. E., MILLER, R.: Adv. Colloid Interface Sci 147-148, 237-50 (2009)

(53) HENDRICKSON, H. S., HENDRICKSON, E. K., JOHNSON, J. L., KHAN, T. H., CHIAL, H. J.: Biochemistry 31, 12169-72 (1992)

(54) ZHOU, C., QIAN, X., ROBERTS, M. F.: Biochemistry 36, 10089-97 (1997)

(55) ZHOU, C., WU, Y., ROBERTS, M. F.: Biochemistry 36, 347-55 (1997)

(56) PIGAULT, C., FOLLENIUS-WUND, A., CHABBERT, M.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 254, 484-9 (1999)

(57) SUMANDEA, M., DAS, S., SUMANDEA, C., CHO, W.: Biochemistry 38, 16290-7 (1999)

(58) FENG, J., WEHBI, H., ROBERTS, M. F.: J. Biol. Chem. 277, 19867-75 (2002)

(59) FENG, J., BRADLEY, W. D., ROBERTS, M. F.: J. Biol. Chem. 278, 24651-57 (2003)

(60) ZHANG, X., WEHBI, H., ROBERTS, M. F.: J. Biol. Chem. 279, 20490-500 (2004)

(61) SHAO, C., SHI, X., WEHBI, H., ZAMBONELLI, C., HEAD, J. F., SEATON, B. A., ROBERTS, M. F.: J. Biol. Chem. 282, 9228-35 (2007)

(62) SHI, X., SHAO, C., ZHANG, X., ZAMBONELLI, C., REDFIELD, A. G., HEAD, J. F., SEATON, B. A., ROBERTS, M. F.: J. Biol. Chem. 284, 15607-18 (2009)

(63) GUO, S., ZHANG, X., SEATON, B. A., ROBERTS, M. F.: Biochemistry 47, 4201-10 (2008)

(64) SHI, X.: *Phosphatidylinositol-specific phospholipase C: Conformational changes upon membrane binding*: Kandidátská disertační práce, Boston College (2010)

(65) GRAUFFEL, C., YANG, B., HE, T., ROBERTS, M. F., GERSHENSON, A., REUTER, N.: J. Am. Chem. Soc. 135, 5740-50 (2013)

(66) HE, T., GERSHENSON, A., EYLES, S. J., LEE, Y. J., LIU, W. R., WANG, J., GAO, J., ROBERTS, M. F.: J. Biol. Chem. 290, 19334-42 (2015)

(67) YANG, B., PU, M., KHAN, H. M., FRIEDMAN, L., REUTER, N., ROBERTS, M. F., GERSHENSON, A.: J. Am. Chem. Soc. 137, 14-7 (2015)

(68) KHAN, H., HE, T., FUGLEBAKK, E., GRAUFFEL, C., YANG, B., ROBERTS, M., GERSHENSON, A., REUTER, N.: Biophys. J. 110, 1367-78 (2016)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka