

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

**Diplomová práce**

**Studium a využití RTX proteinů  
gramnegativních bakterií**

Školitel: Ing. Radim Osička, Ph.D.

Konzultant: Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Praha, 2006

Lenka Sadílková

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Ing. Radima Osičky, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 3. 5. 2006

Podpis: *Sadilková*

Ráda bych poděkovala svému školiteli Ing. Radimu Osičkovi, Ph.D. za vynikající vedení, cenné rady, nekonečnou trpělivost a vlídná vyjádření podpory a pochopení ve chvílích, kdy vše nešlo tak hladce, jak by si byl člověk přál.

Dále pak Ing. Peteru Šebovi, CSc. za finanční zajištění, prostor pro práci a podnětné diskuse a všem členům laboratoře molekulární biologie bakteriálních patogenů za vytvoření neopakovatelné přátelské pracovní atmosféry.

Prof. C. Leclerc a členům její laboratoře v Pasteurově institutu v Paříži za provedené experimenty.

V neposlední řadě též svým rodičům a babičce za naděje, které ve mne vložili, víru, že je dokáži naplnit a lásku, s níž mi dodávali odvahy jít dál.

A na závěr též svému manželovi Františkovi za jeho lásku a porozumnění pro mé rozhodnutí věnovat se práci časově tolik náročné jako je tato.

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>2</b>
2.1	ADENYLÁTCYKLASOVÝ TOXIN (ACT).....	2
2.1.1	<i>Bakterie Bordetella pertussis, pathogenicita a faktory virulence</i> .....	2
2.1.2	<i>Strukturní geny podílející se na produkci, aktivaci a sekreci ACT</i> .....	5
2.1.3	<i>Struktura a funkce ACT</i> .....	7
2.1.4	<i>Mechanismus interakce ACT s cílovými buňkami</i> .....	10
2.1.5	<i>Využití rekombinantního ACT pro dopravu cizorodých epitopů do antigen- prezentujících buněk</i> .....	12
2.2	PROTEIN FRPC .....	17
2.2.1	<i>Bakterie Neisseria meningitidis, pathogenicita, faktory virulence</i> .....	17
2.2.2	<i>Strukturní geny podílející se na produkci a sekreci FrpC</i> .....	19
2.2.3	<i>Struktura a funkce proteinu FrpC</i> .....	21
2.2.4	<i>Systémy pro purifikaci rekombinantních proteinů založené na samoštěpitelných afinitních kotvách</i> .....	23
<b>3</b>	<b>CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE</b> .....	<b>28</b>
3.1	CÍLE STUDIA PROTEINU ACT .....	28
3.2	CÍLE STUDIA PROTEINU FRPC .....	28
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>29</b>
4.1	CHEMIKÁLIE, MATERIÁL A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ .....	29
4.1.1	<i>Seznam použitých chemikálií</i> .....	29
4.1.2	<i>Přístrojové vybavení</i> .....	31
4.1.3	<i>Použité restriční endonukleasy</i> .....	32
4.1.4	<i>Ostatní enzymy</i> .....	33
4.1.5	<i>Použité roztoky a pufrы</i> .....	33
4.1.6	<i>Syntetické oligonukleotidy</i> .....	39

4.1.7	<i>Kultivační média</i> .....	40
4.1.7.1	Tekutá kultivační média.....	40
4.1.7.2	Tuhá kultivační média.....	41
4.1.8	<i>Plasmidy</i> .....	42
4.1.9	<i>Bakteriální kmeny</i> .....	43
4.2	<b>METODY A PRACOVNÍ POSTUPY</b> .....	43
4.2.1	<i>Uchovávání bakteriálních kmenů</i> .....	43
4.2.2	<i>Izolace chromosomální DNA E.coli K12</i> .....	43
4.2.3	<i>Příprava kompetentních buněk Escherichia coli</i> .....	44
4.2.4	<i>Transformace plasmidové DNA do kompetentních buněk</i> .....	44
4.2.5	<i>Izolace plasmidové DNA</i> .....	45
4.2.5.1	Minipreparace plasmidové DNA .....	45
4.2.5.2	Midipreparace plasmidové DNA .....	45
4.2.6	<i>Manipulace s plasmidovou DNA</i> .....	46
4.2.6.1	Štěpení plasmidové DNA restrikčními endonukleasami .....	46
4.2.6.2	Defosforylace 5'-koců lineární plasmidové DNA .....	46
4.2.6.3	Zatupení kohesních konců fragmentů plasmidové DNA .....	46
4.2.6.4	Ligace fragmentů DNA.....	47
4.2.6.5	Amplifikace fragmentů plasmidové DNA .....	47
4.2.6.6	Elektroforesa DNA fragmentů v agarosovém gelu.....	47
4.2.6.7	Izolace DNA fragmentů z agarosového gelu .....	48
4.2.7	<i>Produkce proteinů ve 2 ml kulturách</i> .....	48
4.2.8	<i>Sekvence plasmidové DNA</i> .....	49
4.2.9	<i>Produkce a purifikace ACT a jeho derivátů</i> .....	49
4.2.9.1	Kultivace buněk ve fermentoru.....	49
4.2.9.2	Příprava močovinnového extraktu ACT a jeho derivátů.....	50
4.2.9.3	Purifikace proteinů iontoměničovou chromatografií na DEAE-Sepharose .....	50
4.2.9.4	Purifikace proteinů na hydroxyapatitu .....	51
4.2.9.5	Převedení proteinu do požadovaného pufru gelovou permeační chromatografií na Sephadexu G-25 .....	51
4.2.9.6	Purifikace proteinů hydrofobní chromatografií na Phenyl-Sepharose.....	51
4.2.10	<i>Stanovení lipopolysacharidu</i> .....	52
4.2.11	<i>Kompetiční vazebný experiment – vazba k CHO-CD11b/CD18</i> .....	52
4.2.12	<i>Stanovení prezentace antigenů na MHC molekulách II. třídy</i> .....	53

4.2.13	<i>Produkce a purifikace proteinů použitých při studiu purifikačního systému založeného na SPM proteinu FrpC</i> .....	53
4.2.13.1	Kultivace buněk v 500 ml kulturách .....	53
4.2.13.2	Příprava cytosolického extraktu .....	54
4.2.13.3	Purifikace proteinů afinitní chromatografií na Ni-NTA agarose .....	54
4.2.13.4	Purifikace proteinů afinitní chromatografií na chitinu pomocí systému založeného na inteinu .....	55
4.2.13.5	Purifikace proteinů afinitní chromatografií na chitinu pomocí systému založeného na SPM proteinu FrpC .....	55
4.2.13.6	Purifikace proteinů afinitní chromatografií na amylose .....	55
4.2.13.7	Purifikace proteinů afinitní chromatografií na glutathion agarose .....	56
4.2.13.8	Převedení proteinu do požadovaného pufru gelovou permeační chromatografií na Sephadexu G-25 .....	56
4.2.14	<i>Analýza GST a SPM-C-His pomocí hmotnostní spektrometrie</i> .....	56
4.2.15	<i>Charakterizace SPM-zprostředkovaného štěpení fúzních proteinů</i> .....	57
4.2.16	<i>Densitometrická analýza SDS-PAGE gelů</i> .....	57
4.2.17	<i>Stanovení enzymatické aktivity chloramfenikol acetyltransferasy</i> .....	58
4.2.18	<i>Stanovení enzymatické aktivity <math>\beta</math>-galaktosidasy</i> .....	59
4.2.19	<i>Stanovení katalytické aktivity AC domény ACT</i> .....	59
4.2.20	<i>Elektroforesa v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)</i> .....	60
4.2.21	<i>Stanovení koncentrace proteinů</i> .....	61
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKOVÁ ČÁST</b> .....	<b>62</b>
5.1	VÝSLEDKY STUDIA PROTEINU ACT .....	62
5.1.1	<i>Zavedení nového systému pro expresi rekombinantního ACT a jeho derivátů a jeho porovnání se systémem stávajícím</i> .....	62
5.1.2	<i>Příprava plasmidů pro expresi fúzního proteinu MalE-RTX a jeho delečních variant</i> .....	66
5.1.2.1	Izolace genu kódujícího protein MalE z buněk <i>E. coli</i> K12 .....	66
5.1.2.2	Konstrukce plasmidů nesoucích gen pro protein MalE fúzovaný s genem pro RTX hemolysin ACT nebo s delečními variantami RTX hemolysinu .....	67
5.1.2.3	Konstrukce plasmidu nesoucího gen pro MalE ve fúzi se sekvencí kódující C-terminální histidinovou kotvu .....	71

5.1.3	<i>Fermentační příprava a purifikace fúzního rekombinantního Male-RTX, jeho delečních variant, kontrolního volného Male-C-His a ACT/E5 .....</i>	72
5.1.4	<i>Imunologické využití purifikovaných proteinů .....</i>	75
5.2	<b>VÝSLEDKY STUDIA PROTEINU FRPC .....</b>	<b>79</b>
5.2.1	<i>Konstrukce expresních vektorů pro produkci fúzních proteinů nesoucích samoštěpitelnou afinitní kotvu založenou na SPM proteinu FrpC.....</i>	79
5.2.1.1	<i>Příprava konstruktů pro expresi fúzních proteinů použitých k základní charakterizaci SPM-zprostředkovaného štěpení .....</i>	81
5.2.1.2	<i>Příprava konstruktů pro expresi volných nebo k samoštěpitelné SPM-CBD afinitní kotvě fúzovaných rekombinantních enzymů .....</i>	83
5.2.1.3	<i>Příprava konstruktů pro expresi fúzních proteinů pomocí nichž bude srovnávána účinnost purifikačního systému založeného na SPM se systémem založeným na modifikovaném inteinu .....</i>	86
5.2.2	<i>Produkce proteinů v buňkách E. coli BL21(<math>\lambda</math>DE3) a příprava cytosolických extraktů.....</i>	87
5.2.3	<i>Charakterizace SPM-zprostředkovaného štěpení purifikovaných fúzních proteinů v roztoku.....</i>	87
5.2.4	<i>SPM-zprostředkované štěpení fúzních proteinů po jejich vazbě na afinitní matici.....</i>	94
5.2.5	<i>Ověření zachování enzymatických aktivit rekombinantních proteinů purifikovaných chromatografií založenou na samoštěpitelné SPM-CBD afinitní kotvě .....</i>	97
5.2.6	<i>Porovnání účinnosti purifikačního systému založeného na SPM s komerčním systémem založeným na inteinu S. cerevisiae.....</i>	98
<b>6</b>	<b>DISKUSE .....</b>	<b>101</b>
6.1	DISKUSE PROTEINU ACT .....	101
6.2	DISKUSE PROTEINU FRPC .....	103
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>107</b>
7.1	ZÁVĚR STUDIA PROTEINU ACT.....	107
7.2	ZÁVĚRY STUDIA PROTEINU FRPC .....	108

<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>110</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ ..</b>	<b>117</b>



# 1 Úvod

RTX (Repeat in ToXin) proteiny jsou sekretovány celou řadou gramnegativních bakterií, z nichž většina patří mezi lidské, živočišné nebo rostlinné patogeny (1). Všechny RTX proteiny nesou v C-koncové části molekuly několik charakteristických nonapeptidových repetitivních sekvencí s konsenzuálním motivem L/I/F-X-G-G-X-G-N/D-D-X (kde X je jakýkoliv aminokyselinový zbytek). Tyto repetitivní sekvence se podílejí na vazbě vápenatých iontů a jejich počet je u jednotlivých RTX proteinů různý. RTX proteiny vykazují několik dalších společných rysů, jež je odlišují od ostatních bakteriálních exoproteinů (1):

1. Pro syntézu každého RTX proteinu a jeho sekreci je nutná přítomnost několika genů, z nichž se většina nachází ve stejné části chromosomu a často vytváří operon. V některých případech se tyto geny mohou vyskytovat také na plasmidech.

2. Sekrece RTX proteinů z bakteriální buňky do vnějšího prostředí není závislá na N-koncovém signálním peptidu, ale na sekvenci nacházející se v C-koncové části molekuly, která není během exportu odštěpována. Tato sekvence bývá označována jako C-koncový sekreční signál.

3. Sekrece z buňky probíhá bez přítomnosti periplasmatického intermediátu, mechanismem zahrnujícím rozpoznání C-koncové signální sekvence třemi různými typy membránově asociovaných proteinů, které exportují rozpoznáný protein přímo ven z buňky (sekreční systém typu I).

V rámci celé skupiny RTX proteinů rozlišujeme několik podskupin. Jednotlivé RTX proteiny jsou do nich rozděleny na základě jejich různých aktivit (2): (i) cytolytické toxiny se širokou specifitou k cílovým buňkám (hemolysiny); (ii) cytolytické toxiny s úzkou specifitou k cílovým buňkám (leukotoxiny); (iii) metalloproteasy; (iv) lipasy; (v) proteiny spojené s nodulací; (vi) bakteriociny; (vii) proteiny S-vrstvy a (viii) proteiny s neznámou funkcí.

Nejpočetnější a nejprostudovanější skupinou RTX proteinů jsou RTX toxiny (hemolysiny a leukotoxiny) produkované řadou gramnegativních bakterií, jako např. AaltA *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (3), ApxI-IVA *Actinobacillus pleuropneumoniae* (4), HlyA *Escherichia coli* (5), LktA *Pasteurella haemolytica* (5), RtxA *Vibrio cholerae* (6) a také CyaA *Bordetella pertussis* (7).

## 2 Literární přehled

### 2.1 Adenylátcykloasový toxin (ACT)

#### 2.1.1 Bakterie *Bordetella pertussis*, pathogenicita a faktory virulence

Bakterie *Bordetella pertussis*, původce černého kašle, je krátká, ovoidní, gramnegativní, striktně aerobní, nepohyblivá tyčinka. Kolonizuje výhradně řasinky respiračního epitelu a systémové projevy onemocnění jsou patrné ve vzdálených tkáních v době, kdy mikroorganismy již nejsou přítomny. Do zavedení očkování byl černý kašel jedním z nejzávažnějších onemocnění kojenců a dětí. Ojedinele se však vyskytuje i dnes.

Onemocnění vyvolané *B. pertussis* bylo poprvé popsáno v šestnáctém století. Bakterie byla poprvé izolována a dána do souvislosti s černým kašlem v roce 1906 Bordetem a Gengou (8). Celobuněčná vakcína proti černému kašli byla vyvinuta v roce 1940 (9) a byla připravována chemickou nebo tepelnou inaktivací bakterie *B. pertussis* a podávána v kombinaci s difterickým a tetanovým toxoidem. V roce 1956 byla vyvinuta celobuněčná vakcína tvořená usmrcenými bakteriemi, která se používá k očkování převážné části populace dodnes. Díky této vakcíně se podařilo výrazně omezit počet onemocnění a úmrtí způsobovaných *B. pertussis* a zamezit tak epidemiím. Později bylo zjištěno, že některé celobuněčné vakcíny proti černému kašli mají na lidský organismus řadu vedlejších účinků, jako jsou nevolnost, teplota nebo zvracení. U malého procenta očkovaných dětí se brzy po aplikování vakcíny objevovaly křeče a ve velmi malém počtu případů docházelo k neurologickým poškozením. Bylo také připraveno několik typů bezbuněčných vakcín proti černému kašli složených z jedné nebo více složek, zejména pertusového toxinu a filamentosního hemaglutininu (10-12). I přesto se ale ve světě objeví každý rok 50 miliónů nových případů tohoto onemocnění, a to zejména mezi neimunizovanými jedinci v zemích třetího světa, z nichž přibližně 350 000 končí smrtí (13). Černý kašel tak zůstává i v současnosti jednou z deseti nejčastějších příčin úmrtí na infekční onemocnění.

Počáteční příznaky nemoci jsou podobné jako u běžných infekcí horních cest dýchacích (14, 15). Bakterie adherují na povrch epitelových buněk v průdušnici a bronších. Rychle se zde množí a blokuji funkci řasinek. Nepronikají však do krevního

oběhu ani do dalších tkání. Rozpadlé mikroorganismy uvolňují toxin, který dráždí sliznice, vyvolává katarální příznaky a navozuje výraznou lymfocytózu. Nekrotické okrsky epitelu jsou infiltrovány polymorfonukleárními leukocyty, vzniká peribronchiální zánět a intersticiální pneumonie.

Infekce se přenáší kapénkovou cestou a postihuje především děti v předškolním věku. Lze ji charakterizovat jako lokalizované onemocnění dýchacích cest s některými specifickými projevy jako je paroxysmální kašel, neurologické projevy ("pertussová encefalopatie") a leukocytóza. Průběh onemocnění lze rozdělit do tří klinických stadií. V prvním stadiu, nastupujícím asi pět až sedm dnů po nakažení a trvajícím asi týden, se objevuje necharakteristický kašel. Bakterie, adherující k řasinkám respiračního epitelu, lze vykultivovat z faryngeálních výtěrů. V této fázi je možno rozvoj onemocnění (především délku jeho trvání) ovlivnit antimikrobiální léčbou, vhodný je chloramfenikol, erytromycin nebo ampicilin. Ve druhém až třetím týdnu nastupuje další stadium charakteristické sériově se opakujícími záchvaty kašle provázené dušností, cyanózou a úbytkem hmotnosti. Toto období přetrvává 4-8 týdnů, kultivace bakterií z horních cest dýchacích je již obtížná. Dráždění ke kašli je způsobeno změněnou enzymatickou, hormonální a farmakologickou odpovědí makroorganismu v důsledku invaze mikroorganismu. Konečnou fází je stadium rekonvalescence, v němž záchvaty kašle mizí. Průběh nemoci je často zhoršen druhotnou infekcí pyogenními koky.

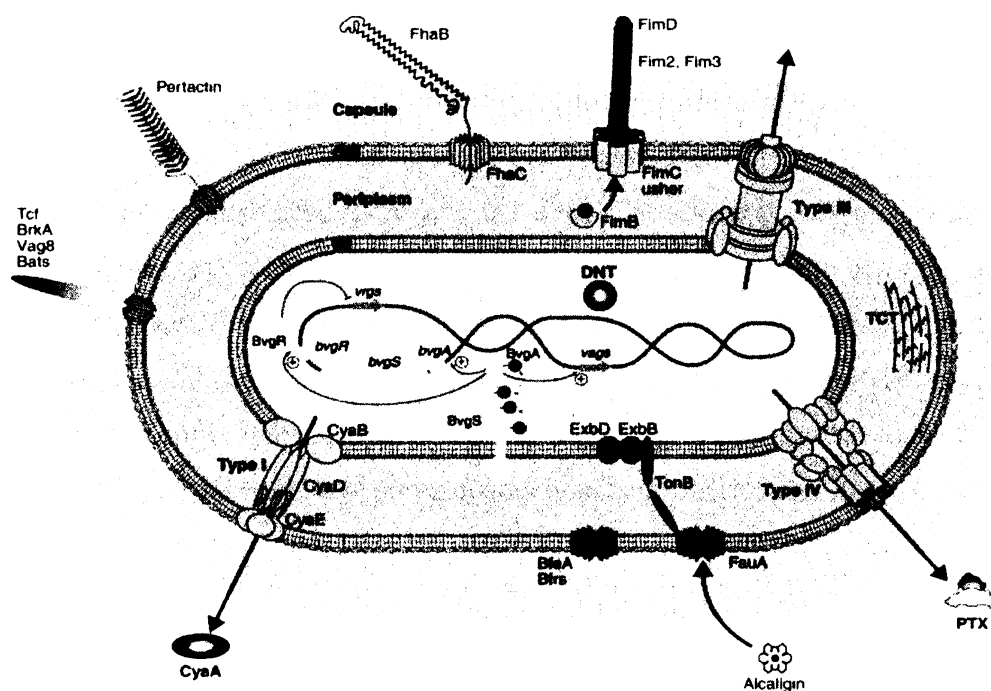
Díky produkci celé řady faktorů virulence způsobujících stav lokální imunosuprese je *B. pertussis* schopna unikat aktivní imunitní odpovědi a přetrvávat v hostiteli. Tyto faktory virulence lze rozdělit na adhesiny a toxiny (Obr. 1) (16-19).

Adhesinů *B. pertussis* je známo několik: filamentosní hemaglutinin, který umožňuje bakteriím adhezi k buňkám respiračního epitelu, pertusový toxin, který napomáhá vazbě bakterií na povrch řasinkových a fagocytujících buněk a dále fimbrie, pertaktin a tracheální kolonizační faktor (20). Pertusový toxin má funkci adhesinu i toxinu.

Toxiny bakterie jsou známy čtyři: dermonekrotický toxin, tracheální cytotoxin, pertusový toxin a adenylátcyklasový toxin.

Tracheální cytotoxin (TCT) je degradačním produktem recyklačního procesu peptidoglykanu, blokuje funkci řasinek, indukuje produkci interleukinu-1 a syntézu oxidu dusného (21, 22).

Pertusový toxin (PTX) je členem skupiny bakteriálních ADP-ribosyl transferas, které mají schopnost modifikovat regulační G proteiny hostitele, jež za normálních okolností inhibují adenylátcyklasu. PTX je sekretovaný toxin typu A-B<sub>5</sub> (23, 24). Pět podjednotek B zajišťuje vazbu na specifické buněčné receptory a umožňuje tak katalytické části A průnik do cílových buněk. Část A představuje enzymatickou podjednotku, která katalysuje přenos ADP-ribosylu z NAD<sup>+</sup> na regulační GTP<sub>i</sub>-vazebný protein. To vede k nekontrolovatelnému zvýšení hladiny intracelulárního cAMP, způsobeného neschopností modifikovaného GTP<sub>i</sub> proteinu inhibovat adenylátcyklasu, a tím k ovlivnění fyziologie napadené buňky. PTX zesiluje i některé hormonální aktivity, především způsobuje hypoglykémii, zvyšuje citlivost na histamin a kapilární permeabilitu. Tyto účinky mohou přispět k rozvoji šoku.



Obr. 1: Faktory virulence *B. pertussis*. Schématické znázornění bakterie *B. pertussis*, jednotlivých proteinů jakožto faktorů virulence a jejich umístění, případně způsob sekrece z buňky (16).

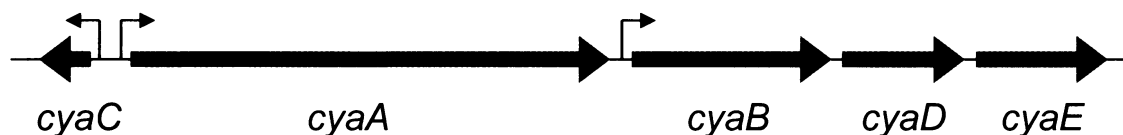
Dermonekrotický toxin je termolabilní protein s deaminační a transglutaminasovou aktivitou, který v cílových buňkách konstitutivně aktivuje Rho GTPasy, čímž dochází k ovlivnění celé řady signalizačních drah, na jejichž regulaci se tyto proteiny podílí (25-29).

Adenylátcyklasový toxin (ACT) má zásadní význam pro virulenci *B. pertussis*, neboť mutantní kmeny bakterie neschopné produkovat ACT jsou zcela avirulentní (20, 30-32). Proto by mohl být ACT, jako hlavní faktor virulence bakterie *B. pertussis*, vhodným kandidátem pro novou bezbuněčnou vakcínu proti černému kašli (33).

### **2.1.2 Strukturní geny podílející se na produkci, aktivaci a sekreci ACT**

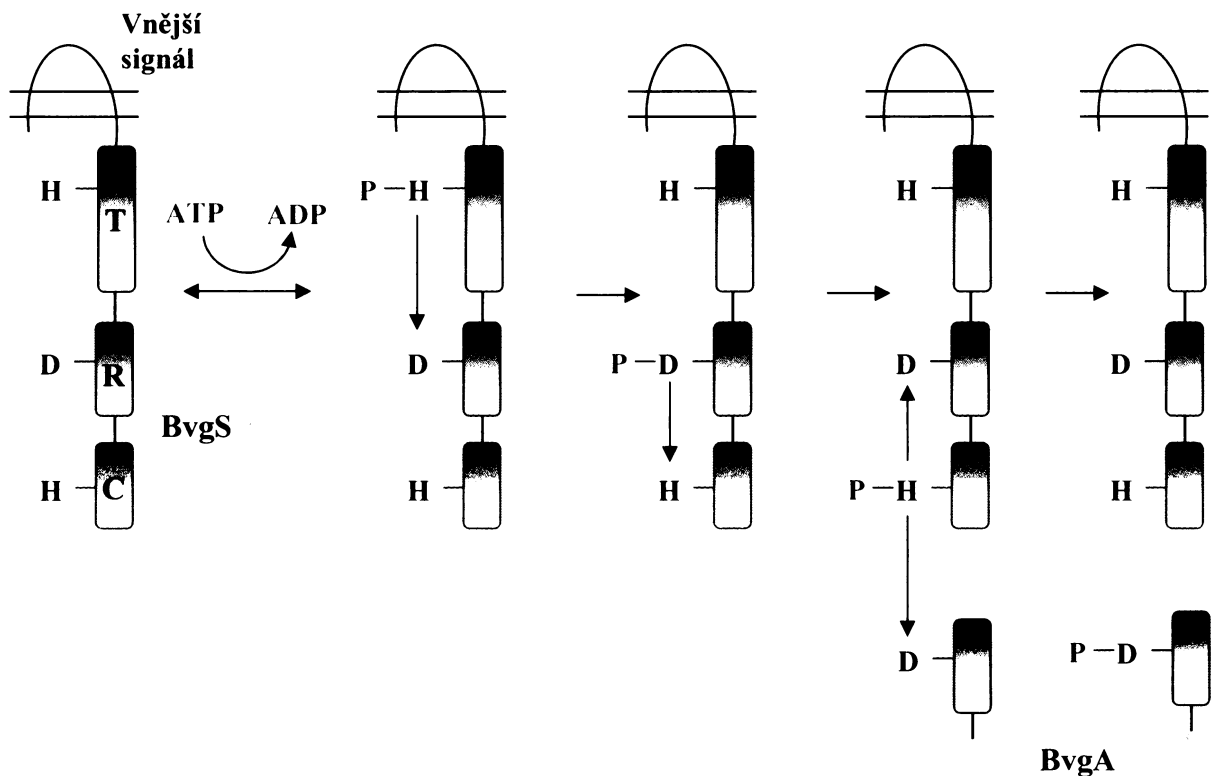
Pro syntézu, aktivaci a sekreci proteinu ACT je nutná přítomnost pěti strukturních genů, které jsou na bakteriálním chromosomu umístěny bezprostředně za sebou (Obr. 2) (7, 34). Gen *cyaA* kóduje inaktivní protoxin, který je převáděn do aktivní formy posttranslační modifikací produktem genu *cyaC* (35). Zbývající tři strukturní geny, *cyaB*, *cyaD* a *cyaE*, kódují proteiny nezbytné pro sekreci ACT (34).

Geny *cyaABDE* jsou seskupeny v *cya* operon a jsou přepisovány ze společného promotoru umístěného před genem *cyaA* (36). Transkripce z tohoto promotoru je pozitivně regulována prostřednictvím proteinů, které jsou kódovány *bvg* operonem (viz dále). Geny *cyaBDE* mohou být přepisovány také z promotoru, který je umístěn mezi geny *cyaA* a *cyaB* (36). Tento promotor je však narozdíl od předešlého konstitutivní povahy a umožňuje syntézu pouze malých množství *cyaBDE* mRNA. Gen *cyaC* je umístěn před *cya* operonem a je přepisován v opačném směru (Obr. 2) (34).



Obr. 2: **Schématické znázornění *cya* lokusu.** Barevné šipky znázorňují strukturní geny nezbytné pro syntézu (červeně), aktivaci (zeleně) a sekreci (modře) ACT. Černé tenké šipky znázorňují promotor, z něhož jsou geny přepisovány (36).

Expresí genů kódujících celou řadu faktorů virulence *B. pertussis*, včetně genu pro ACT, je pod kontrolou *bvg* operonu (*Bordetella virulence gene*) (33, 37). Produktem genů tohoto lokusu je dvousložkový systém účastnící se přenosu signálu z vnějšího prostoru bakterie. Skládá se z genů *bvgA* a *bvgS*, které kódují cytoplasmatický aktivátor transkripce BvgA a transmembránový protein BvgS (38). BvgS je transmembránová histidinová kinasa fungující jako senzor reagující na signály z vnějšího prostředí autofosforylací a poté přenosem fosfátu na DNA-vazebný transkripční aktivátor BvgA (Obr. 3) (39). Molekula BvgA je fosforylací aktivována a váže se na specifické sekvence nacházející se v promotorových oblastech genů důležitých pro virulenci bakterie, čímž dochází k aktivaci jejich transkripce (40-42).

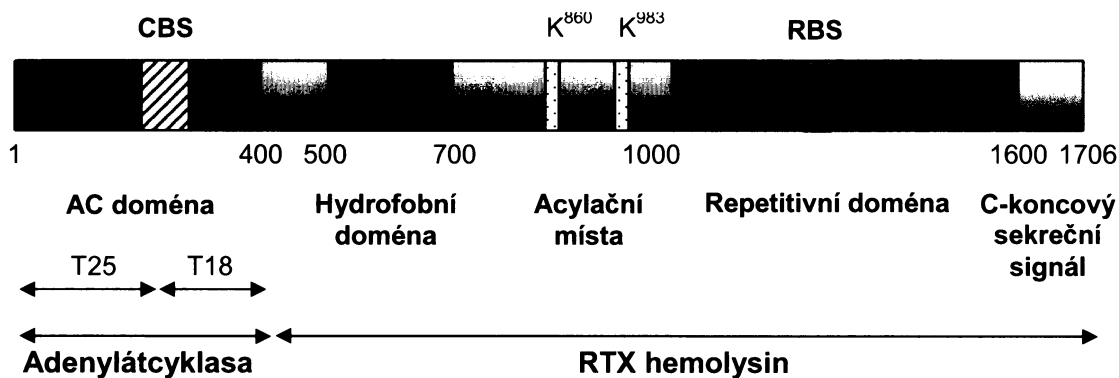


Obr. 3: **Model BvgS-BvgA fosforylační kaskády.** N-koncová doména BvgS přijímá vnější signál, což vede k autofosforylaci přenašečové domény (T) na histidinovém zbytku. Fosfátová skupina je pak přenesena na zbytek aspartátu přijímačové domény (R) a poté na další zbytek histidinu C-koncové části (C) BvgS. Z něj je nakonec přenesena na aspartátový zbytek aktivátoru transkripce BvgA, který aktivuje geny důležité pro virulenci bakterie (33).

### 2.1.3 Struktura a funkce ACT

ACT je 1706 aminokyselinových zbytků dlouhý protein o molekulové hmotnosti 177 kDa, sestávající ze dvou strukturně i funkčně odlišných celků, adenylátcyklasové (AC) domény a RTX hemolysinu (Obr. 4) (34, 43, 44). Hlavní biologickou aktivitou toxinu je jeho schopnost inzerce do membrán různých typů eukaryotních buněk spojená s translokací enzymatické AC domény do cytosolu napadené buňky. V cytosolu je adenylátcyklasa aktivována eukaryotním kalmodulinem a katalyzuje konverzi vnitrobuněčného ATP na cAMP (34, 45), což vede k nekontrolovatelnému nárůstu hladiny cAMP. Jelikož je cAMP klíčovou molekulou buněčné signalizace, dochází ke ztrátě schopnosti efektorových buněk imunitního

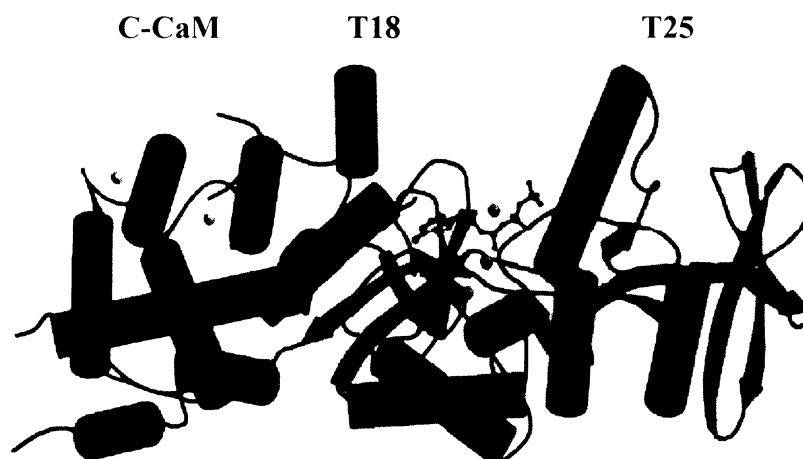
systému fagocytovat mikroorganismy, vyhledávat je v procesu chemotaxe, produkovat superoxidové radikály a vykonávat další fyziologické funkce nezbytné k likvidaci patogenního mikroorganismu (46).



Obr. 4: **Schématické znázornění molekuly ACT.** AC doména je složena ze dvou subdomén, T18 a T25, obsahujících vazebné místo pro kalmodulin (CBS). C-koncová RTX hemolysinová část se skládá z hydrofobní domény, oblasti účastnící se aktivace toxinu zbytkem mastné kyseliny na lysinových zbytcích v pozicích 860 a 983, repetitivní domény tvořené 45 nonapeptidovými sekvencemi vázajícími vápenaté ionty, oblasti zodpovědné za vazbu na receptor (RBS) a C-koncového sekrečního signálu (34).

Katalytická AC doména je tvořena prvními 400 aminokyselinovými zbytky a skládá se ze dvou subdomén, T25 (zbytky 1-224) a T18 (zbytky 225-399), které mohou být *in vitro* získány limitovanou proteolýzou (47). Izolované T25 a T18 fragmenty pak mohou být prostřednictvím kalmodulinu spojeny v ternární komplex s plně funkční AC aktivitou (48, 49). Srovnáním aminokyselinové sekvence AC domény se sekvencemi jiných prokaryotních a eukaryotních ATP-vazebných proteinů byla v této doméně odhalena vysoce konzervativní oblast (zbytky 54-70), která se podílí na tvorbě aktivního centra adenylátcyklasy (46, 48, 50). Dále bylo ukázáno, že aspartátové zbytky v pozici 188 a 190 jsou nezbytné pro vazbu komplexu  $\text{ATP-Mg}^{2+}$  (51, 52). Předpokládalo se, že vazebné místo pro kalmodulin se nachází v okolí tryptofanového zbytku 242 a je tvořeno přibližně 70 aminokyselinovými zbytky (50). Nedávno zveřejněná krystalová struktura AC domény s C-koncovou částí kalmodulinu (Obr. 5) skutečně ukázala roli tryptofanového zbytku 242 v této interakci (52).





Obr. 5: **Struktura AC domény ACT v komplexu s kalmodulinem.** Červeně je vyznačena C-terminální globulární doména kalmodulinu. Domény T18 a T25 molekuly ACT jsou znázorněny modře a zeleně. Přítomnost vápenatých (žlutě) a hořečnatých iontů (oranžově) je pro vzájemnou interakci obou proteinů nezbytná (52).

Interakci ACT s membránou cílových buněk zabezpečuje druhá část toxinu, tzv. RTX hemolysin, který je tvořen 1306 C-koncovými aminokyselinovými zbytky. RTX hemolysin se podobá jak svojí primární strukturou, tak i funkcí ostatním RTX toxinům (53, 54). Všechny RTX toxiny obsahují několik konzervativních oblastí (1, 53-55). První z nich je hydrofobní doména, která se v molekule ACT nachází mezi zbytky 500-700 a je tvořena dlouhými sekvencemi hydrofobních aminokyselinových zbytků, které mají schopnost v cytoplasmatické membráně cílových buněk vytvářet kationselektivní iontové kanály (56, 57). Transport iontů těmito kanály může vyvolat vstup vody do buněk a jejich osmotickou lýzi, což se projevuje jako typická hemolytická aktivita vůči červeným krvinkám (58). Ve srovnání s ostatními RTX hemolysiny je však tato hemolytická aktivita u ACT velmi nízká. Proto se předpokládá, že hlavní funkcí hemolysinové části není lýze buněk, ale zprostředkování sekrece katalytické AC domény z bakteriální buňky a její přenos přes cytoplasmatickou membránu cílových buněk (59).

ACT je syntetizován jako inaktivní protoxin, pro jehož cytotoxickou aktivitu je nezbytná posttranslační modifikace prostřednictvím proteinu CyaC (20 kDa), který je exprimován spolu s ACT v buňkách *B. pertussis* (35) a funguje jako acyltransferasa

katalyzující přenos acylu z acyl-ACP (AcyCarrier Protein) na protoxin (35, 60). Pomocí hmotnostní spektrometrie byla povaha této modifikace studována jak u toxinu syntetizovaného a aktivovaného v *B. pertussis* (*Bp*-ACT), tak u rekombinantního toxinu získaného po expresi genů pro ACT a CyaC v *E. coli* (*r-Ec*-ACT). Bylo ukázáno, že aktivace *Bp*-ACT spočívá v kovalentní modifikaci zbytkem kyseliny palmitové, která je vázána prostřednictvím amidové vazby k  $\epsilon$ -aminoskupině lysinového zbytku v pozicích 860 a 983 (61, 62). Oproti tomu u *r-Ec*-ACT byla na lysinových zbytcích 860 a 983, kromě modifikace palmitátem, nalezena ze 60 % také acylace zbytkem kyseliny palmitolejové (62, 63).

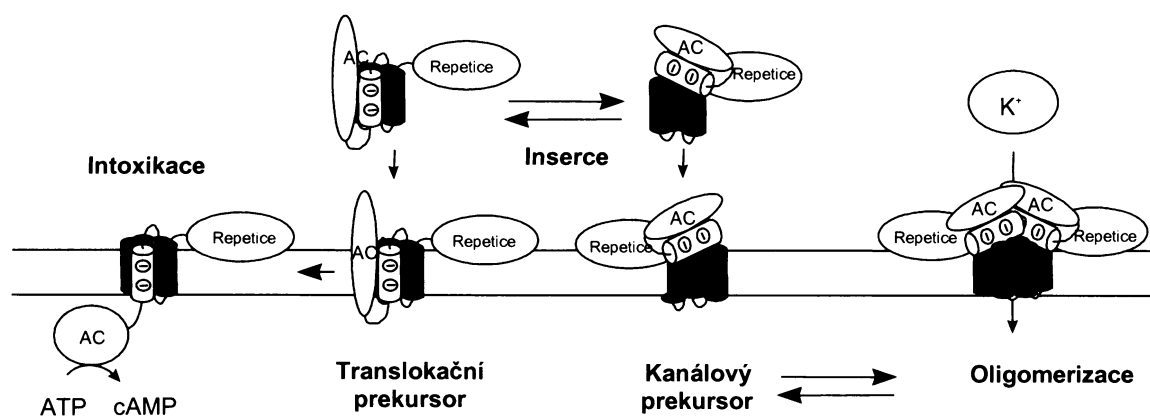
Další součástí RTX hemolysinu je repetitivní doména, která se nachází mezi zbytky 1000-1600 a je tvořena 45 nonapeptidovými repetitivními sekvencemi vytvářejícími vazebná místa pro vápenaté ionty. Vazba vápenatých iontů do těchto vazebných míst vede k výrazným konformačním změnám v molekule ACT, které jsou nezbytné pro biologické aktivity toxinu (64, 65). Nachází se zde i oblast zodpovědná za vazbu na integrinový receptor CD11b/CD18, jak bude vysvětleno dále.

Poslední součástí RTX hemolysinu je C-koncový sekreční signál. ACT je, stejně jako všechny ostatní RTX proteiny, sekretován z bakteriální buňky prostřednictvím sekreční dráhy typu I, která se liší od dalších sekrečních drah gramnegativních bakterií v několika aspektech (66, 67): (i) je tvořena pouze třemi různými typy proteinů, z nichž první dva jsou ve vnitřní membráně (CyaB a CyaD) a jsou specifické pro přenášený protein, třetí je ve vnější membráně a tvoří nespecifický pór (CyaE); (ii) tyto proteiny vytváří kanál, který spojuje vnitřní a vnější membránu; (iii) přenášené proteiny jsou sekretovány přímo do extracelulárního prostředí bez tvorby periplasmatických meziproductů; (iv) sekreční signál rozpoznávaný tímto sekrečním systémem je lokalizován na C-konci přenášeného proteinu; (v) sekreční signál není odštěpován během sekrece nebo po sekreci.

#### **2.1.4 Mechanismus interakce ACT s cílovými buňkami**

ACT je schopen pronikat přes cytoplazmatickou membránu cílových buněk přímo, nezávisle na receptorem zprostředkované endocytóze, která je typická pro internalizaci jiných bakteriálních toxinů. Mechanismus inserce molekuly ACT do

membrány cílových buněk, stejně tak jako přenosu katalytické AC domény do jejich cytosolu a tvorby membránových kation-selektivních iontových kanálů je prozatím poměrně málo charakterizován. Celý proces vyžaduje strukturální integritu a kooperaci všech domén celé hemolysinové části ACT, posttranslační modifikaci proteinu zbytkem mastné kyseliny a fyziologické koncentrace vápenatých iontů (59, 61, 68-70). Nedávno byl navržen model mechanismu působení ACT (Obr. 6), v němž toxin interaguje s cílovou membránou současně dvěma různými způsoby (71). První způsob vede k inzerci ACT do cílové membrány a přenosu AC domény do buněk, aniž by muselo docházet k tvorbě membránových kanálů a druhý k inzerci molekul toxinu do membrány a následnému vzniku oligomerních kanálů. Který ze způsobů bude preferován závisí na typu acylace ACT, teplotě, koncentraci vápenatých iontů a vlastnostech cílové membrány.



Obr. 6: **Model interakce ACT s cílovou membránou.** Toxin se může vázat do cytoplasmatické membrány nezávisle na přítomnosti receptoru, translokovat AC doménu do cytosolu buňky nebo oligomerizovat a vytvářet póry selektivní pro kationty. AC- adenylátcyklasa,  $K^+$  - kationt (71).

Dlouhou dobu se předpokládalo, že ACT pro interakci s cílovou membránou nepotřebuje žádný specifický proteinový receptor, a že výše popsany model přímé translokace je jediným způsobem vstupu ACT do buněk. Nedávno ale bylo ukázáno, že se ACT váže s vysokou afinitou k integrinovému receptoru CD11b/CD18 ( $\alpha_M\beta_2$ , Mac-1, CR3), který se nachází na povrchu některých typů leukocytů, a že k průniku toxinu do buněk dochází také prostřednictvím receptorem zprostředkované endocytózy (72,

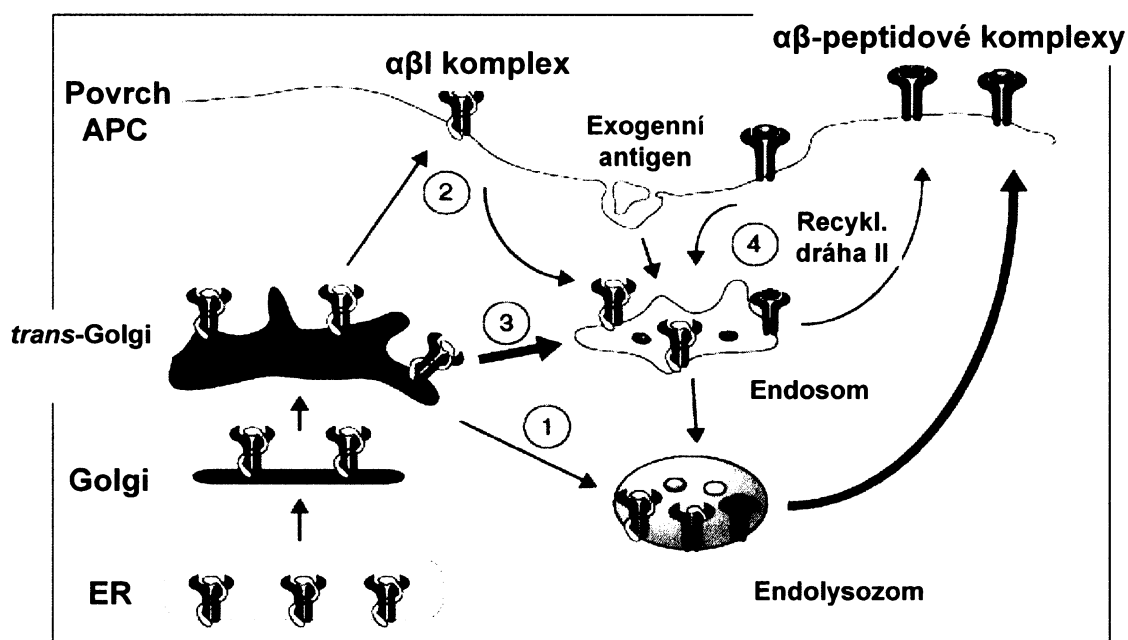
73). Vazba ACT k integrinu CD11b/CD18 je saturevatelná, závislá na přítomnosti vápenatých iontů a je inhibována specifickými monoklonálními protilátkami namířenými proti podjednotce CD11b, což naznačuje, že se při interakci s toxinem pravděpodobně uplatňuje tato podjednotka (72). Na integrinový receptor se ACT váže v oblasti repetitivní domény toxinu mezi aminokyselinovými zbytky 1166 až 1281 (74). Navíc bylo potvrzeno, že se ACT váže také na buňky nemající CD11b/CD18 receptor, přičemž ale tato vazba je nesaturevatelná a mnohem méně účinná, než saturevatelná vazba toxinu na buňky s receptorem (72).

### **2.1.5 Využití rekombinantního ACT pro dopravu cizorodých epitopů do antigen-prezentujících buněk**

U obratlovců existují dva základní typy antigen-specifické imunitní odpovědi: humorální (protilátková) imunitní odpověď a buněčně zprostředkovaná imunitní odpověď (75). Při napadení organismu cizorodými látkami, mikroorganismy a viry se oba tyto typy uplatňují prakticky vždy společně, i když v různé míře. Humorální imunitní odpověď působí hlavně proti extracelulární fázi bakteriální a virové infekce a proti rozpustným antigenům. Je zabezpečována rozmanitým souborem sérových imunoglobulinů - protilátek. Ty jsou produkovány plazmatickými buňkami vznikajícími z aktivovaných B-lymfocytů. Buněčně zprostředkovaná imunitní odpověď ochraňuje organismus před buňkami infikovanými viry nebo jinými intracelulárními parazity, cizími tkáněmi a také před některými typy transformovaných buněk. Je zprostředkována především NK-buňkami (Natural Killer) a cytotoxickými T-lymfocyty ( $CD8^+$  T-lymfocyty, CTL), které se podílejí na cytotoxické destrukci infikovaných nebo jinak abnormálních buněk. Oba typy imunitní odpovědi jsou podporovány pomocnými T-lymfocyty ( $CD4^+$  T-lymfocyty).

Jedním z nejdůležitějších kroků při aktivní imunizaci proti virovým infekcím nebo intracelulárním mikrobiálním parazitům je proto navození buněčně zprostředkované imunitní odpovědi, která je zabezpečována  $CD8^+$  T-lymfocyty. Navození tohoto typu imunitní odpovědi je však mnohem obtížnější, než indukce protilátkové imunitní odpovědi. Tu lze zpravidla poměrně snadno vyvolat opakovaným podáváním dostatečného množství takového antigenu, proti kterému chceme, aby byla

namířena. Tento exogenní antigen, vpravený do těla jedince při imunizaci, vstupuje do endocytické dráhy antigen-prezentující buňky (APC) a po jeho proteolytickém štěpení jsou vzniklé peptidové fragmenty vázány na molekuly glykoproteinů hlavního histokompatibilitního komplexu (MHC) II. třídy (Obr. 7) a prezentovány tak  $CD4^+$  T-lymfocytům, což vede k jejich aktivaci (76, 77). Aktivované  $CD4^+$  T-lymfocyty se poté podílejí na aktivaci B-lymfocytů, čímž dochází k jejich přeměně v plazmatické buňky produkující protilátky rozpoznávající příslušné peptidy.



Obr. 7: Schéma transportu MHC molekul II. třídy v rámci APC a prezentace komplexů antigen-molekula MHC II na povrchu APC. V endoplasmatickém retikulu asociují  $\alpha\beta$  dimery (černé klíšťky) budoucí MHC molekuly se svými invariantními řetězci (bílé smyčky) za vzniku trimerů molekul MHC II. třídy. Ty jsou následně transportovány do Golgiho aparátu. Z *trans*-Golgi jsou pak trimerní komplexy odvedeny do endocytické dráhy, do kompartmentů, v nichž dochází ke zpracování antigenů, a prostřednictvím fúze k molekulám MHC II následně k jejich prezentaci na buněčném povrchu APC. Přitom cesty vedoucí ke zpracování a prezentaci antigenů na MHC molekulách II. třídy jsou v zásadě čtyři, vedoucí: (1) přímo ke zpracování v lysozomu/endolysozomu, kde jsou (což platí i pro všechny další body) invariantní řetězce MHC II molekul degradovány a na jejich místo jsou do dimerní molekuly MHC II navázány antigenní peptidy (znázorněny barevnými ovály) a celý komplex je poté vystaven na povrchu APC, (2) nepřímo,

transitem k buněčnému povrchu a poté ke zpracování v endosomu, (3) nepřímo do endosomu a (4) přímo do endosomu, přičemž touto drahou jsou internalizovány a recyklovány již dříve vystavené komplexy (76).

Hlavním problémem při navození buněčně zprostředkované imunitní odpovědi je, že  $CD8^+$  T-lymfocyty vyžadují ke své aktivaci peptidové fragmenty vázané na molekuly MHC I. třídy. Ty ale vážou téměř výhradně peptidové fragmenty, které vznikají odbouráváním endogenních buněčných proteinů v cytosolu, a to hlavně působením velkého proteolytického komplexu, proteasomu (Obr. 8) (76, 77). K vyvolání tohoto typu imunitní odpovědi proto nestačí použít antigeny, které vstupují do buněk prostřednictvím endocytózy. Je nutné použít takové plasmidy, které umožní dopravu příslušného antigenu přímo do cytosolu buňky, čímž je zajištěna jeho degradace proteasomem a prezentace vzniklých peptidových fragmentů prostřednictvím MHC I. třídy.



Obr. 8: Schéma prezentace antigenů prostřednictvím molekul MHC I. třídy. Intracelulární proteiny (tedy i ty, jenž jsou původem z různých druhů

intracelulárních patogenů) jsou degradovány v proteasomu a vzniklé peptidové fragmenty jsou translokovány ABC transportérem TAP do lumen endoplasmatického retikula. Skrze makromolekulární proteinový komplex jsou peptidové fragmenty postupně přenášeny na volné MHC molekuly I. třídy a následně je tento komplex transportován sekrečním aparátem na povrch APC, kde jsou komplexy MHC I-peptid rozpoznávány cytotoxickými T-lymfocyty (78).

Pro tyto účely se zdá být velmi vhodným nástrojem molekula ACT, s níž bylo v této oblasti dosaženo v posledních patnácti letech celé řady pozitivních výsledků. V AC doméně tohoto toxinu byla identifikována permissivní místa, do nichž lze vložit cizorodé peptidy složené až ze 100 aminokyselinových zbytků, aniž by jejich přítomnost jakkoliv ovlivnila stabilitu a biologické aktivity vzniklého rekombinantního ACT (79, 80). Jedno z těchto míst (mezi zbytky 224 a 225 AC domény) bylo využito pro vložení dvou virových CD8<sup>+</sup> T-buněčných epitopů, jednoho epitopu z nukleoproteinu LCMV (Lymphocytic ChorioMeningitis Virus) a jednoho epitopu z V3 oblasti gp120 HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus). Geneticky detoxifikované molekuly ACT nesoucí jmenované epitopy byly poté úspěšně použity k aktivaci CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů jak *in vitro*, tak *in vivo* (81, 82), přičemž k prezentaci vložených antigenů docházelo způsobem popsáným výše. Navíc, myši očkované pomocí detoxifikovaného ACT nesoucího LCMV epitop byly chráněny proti letálním dávkám viru LCMV. Podobně také u myši imunizovaných ACT toxoidem nesoucím epitop z kuřecího ovalbuminu (OVA) došlo k navození imunitní odpovědi cytotoxických T-lymfocytů směřované proti tomuto epitopu (83). Byl též připraven rekombinantní ACT nesoucí v AC doméně všechny tři zmíněné modelové CD8<sup>+</sup> T-buněčné epitopy (LCMV, V3 gp120 a OVA) a s tímto toxoidem bylo dosaženo prezentace všech tří epitopů na molekulách MHC I. třídy najednou a proti všem třem epitopům byla indukována specifická cytotoxická odpověď (84).

Jak již bylo zmíněno výše, byl před nedávnem na povrchu APC objeven pro ACT specifický receptor CD11b/CD18 (72). To naznačilo, že by bylo možné ACT využít také pro dopravu cizorodých epitopů do APC prostřednictvím receptorem-zprostředkované endocytózy, čímž by byla umožněna jejich prezentace na molekulách MHC glykoproteinů II. třídy. Bylo ukázáno, že molekuly ACT je skutečně možné využít jako nástroje pro dopravu CD4<sup>+</sup> cizorodých epitopů do cytosolu APC (CD4<sup>+</sup>

specifický M<sub>1</sub>E epitop) a navodit tak aktivaci CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů (85). Navíc bylo ukázáno, že ACT může současně dopravovat do APC jak CD8<sup>+</sup>, tak CD4<sup>+</sup> epitopy, pokud jsou vloženy do jedné molekuly ACT, a aktivovat tak současně CD8<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty (86).

Účinnost ACT při dopravě antigenů do APC byla v minulosti mnohokrát potvrzena v preklinických studiích na zvířecích modelech a v současnosti se připravují první klinické studie. Ve fázi výroby klinické šarže je rekombinantní ACT toxoid nesoucí CD8<sup>+</sup> antigen E7 lidského papiloma viru 16 (87) a následovat bude fáze klinických testů na pacientkách trpících karcinomem děložního čípku. Probíhá též příprava klinických testů pro terapii metastazujících melanomů (88).

Kromě toho bylo nedávno ukázáno, že fúze ACT s mykobakteriálními antigeny (CFP10, ESAT-6) může v budoucnu sloužit jako nástroj pro zlepšení diagnostiky latentní tuberkulózy, neboť zvyšuje účinnost jejich rozpoznávání imunitním systémem (89).



## 2.2 Protein FrpC

### 2.2.1 Bakterie *Neisseria meningitidis*, pathogenicita, faktory virulence

*Neisseria meningitidis* (meningokok) je gramnegativní, striktně aerobní diplokok, nesporeující, ve většině případů opouzdřený. Bakterie je přirozeným primárním patogenem pouze pro člověka, u kterého vyvolává v závislosti na zatím ne zcela jasných faktorech různé druhy onemocnění. Na základě rozdílů v polysacharidovém složení kapsule rozlišujeme 13 séro skupin *N. meningitidis*, vyskytujících se v různých časových obdobích, geografických polohách a u různých věkových skupin populace. Nejčastějšími původci onemocnění jsou bakterie séro skupin A, B, C, Y a W-135.

Přestože je *N. meningitidis* známá zejména jako původce meningitid, ať už sporadického či epidemického charakteru, primárně je to lidský komenzál, kolonizující především sliznici nosohltanu a to až 10 % zdravé populace (90). Běžně zde roste epifyticky, nebo může být původcem nasofaryngitidy. S vyšší frekvencí se asymptomatické nosičství vyskytuje v souvislosti s epidemiemi meningitidy v Subsaharské Africe a též v uzavřených komunitách (91, 92). Z oblasti nosohltanu může *N. meningitidis* proniknout do krevního oběhu a vyvolat bakteriémií, provázenou příznaky intoxikace uvolněným endotoxinem. Velká účast endotoxinu, lipooligosacharidu (LOS), nejdůležitějšího antigenu meningokokového onemocnění, je usnadněna autolytickými enzymy meningokoků, které jej uvolňují z bakteriální stěny. Pouze v některých případech dochází k průniku meningokoka přes hematoencefalickou bariéru do cerebrospinální tekutiny a ke vzniku hnisavé meningitidy. Ta je však charakteristická velmi rychlým začátkem (50 % pacientů: anamnéza < 24 hod.) projevujícím se zejména vysokou horečkou, úpornými bolestmi hlavy, zvracením, svalovými křečemi, později petechiálním exantémem a v konečném stádiu pacient ztrácí vědomí v důsledku obrny hlavových nervů. K plnému rozvoji onemocnění dochází již v průběhu několika hodin a bez okamžitého terapeutického zásahu spočívajícího v podání vysokých dávek antibiotik (penicilin G, ampicilin, cefalosporiny) a kortikoidů téměř ve všech případech končí smrtí. Zvýšené riziko meningokokového onemocnění je především u dětí mladších 2 let a dospívajících (93).

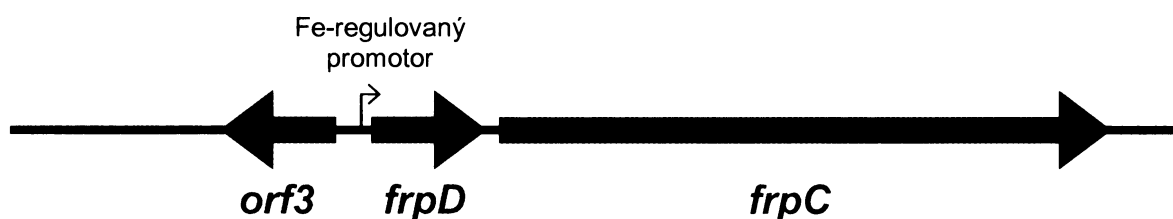
Přestože včasná terapie meningokokového onemocnění výrazně snižuje riziko úmrtí, účinná prevence ve formě vakcinace se zdá být nezbytnou. V současné době jsou meningokokové vakcíny dostupné ve dvou formách, polysacharidové a konjugované. Polysacharidová vakcína nevyvolává aktivaci T-buněk imunitního systému (a tedy imunologickou paměť), ale stimuluje zralé B-lymfocyty k produkci protilátek. Konjugovaná vakcína kovalentně váže polysacharid k proteinovému nosiči a má za následek stimulaci T-buněk, a tedy dlouho trvající imunitu. Jak tetravalentní polysacharidová vakcína (obsahuje polysacharidové antigeny skupin A, C, Y a W-135), tak i konjugovaná vakcína (A + C) jsou poměrně účinnou ochranou proti meningokokovému onemocnění. Účinnost tetravalentní polysacharidové vakcíny je pro skupiny A a C u školních dětí a dospělých až 85 % a na trhu se již objevila a uspokojivé výsledky přinesla i tetravalentní vakcína (A, C, Y, W-135) konjugovaná s difterickým toxoidem. Protektivní účinek vůči jedné séroskupině však nijak nezajišťuje ochranu vůči séroskupině jiné (94).

V současné době jsou velmi intenzivně studovány molekulární mechanismy podílející se na pathogenezi invazivního meningokokového onemocnění. Bylo ukázáno, že mezi hlavní faktory virulence meningokoka patří jeho povrchové komponenty: pili, Opa a Opc, což jsou proteiny vnější membrány, které se podílejí na adhesi bakterií k hostitelským buňkám a jejich internalizaci (95-97), lipooligosacharid, polysacharidová kapsule zabraňující fagocytóze bakterií a mající ochranné účinky zaměřené především proti baktericidním účinkům komplementu (98, 99) a dále řada systémů pro získávání iontů železa, které jsou nezbytné k množení meningokoka jak na sliznici, tak v krevním řečišti (100). Dalším faktorem virulence je IgA1 proteasa, která je sekretována do vnějšího prostředí (101). Funkcí IgA1 proteasy je zabránit aglutinaci a mechanické likvidaci bakterie vyvolané působením molekul IgA1, přítomných v epitelu sliznice nosohltanu. Po navázání IgA1 proteasy dochází ke štěpení v pantové oblasti lidského IgA1 (102), a tedy k oddělení antigen vazebného (Fab) a konstantního fragmentu (Fc). Uvolněný Fab fragment je však stále schopen vazby na antigen, čímž maskuje epitopy na povrchu bakterie, které by jinak byly rozpoznány neporušenými imunoglobuliny. Nicméně narušil od jiných gramnegativních patogenních bakterií, nebyl u *N. meningitidis* objeven žádný "klasický" exotoxin, který by se na vzniku či průběhu onemocnění podílel. Při studiu proteinů vnější membrány bakterie

*N. meningitidis* FAM20, jejichž produkce je regulována v závislosti na koncentraci iontů železa v prostředí, byly však zcela neočekávaně nalezeny proteiny FrpA a FrpC (Fe-regulated protein), které byly na základě jejich sekvenční homologie zařazeny do rodiny RTX proteinů (103, 104). Vzhledem k tomu, že celá řada RTX proteinů patří mezi důležité faktory virulence, je možné předpokládat, že také proteiny FrpA a FrpC by mohly hrát určitou roli v pathogenesi meningokokového onemocnění.

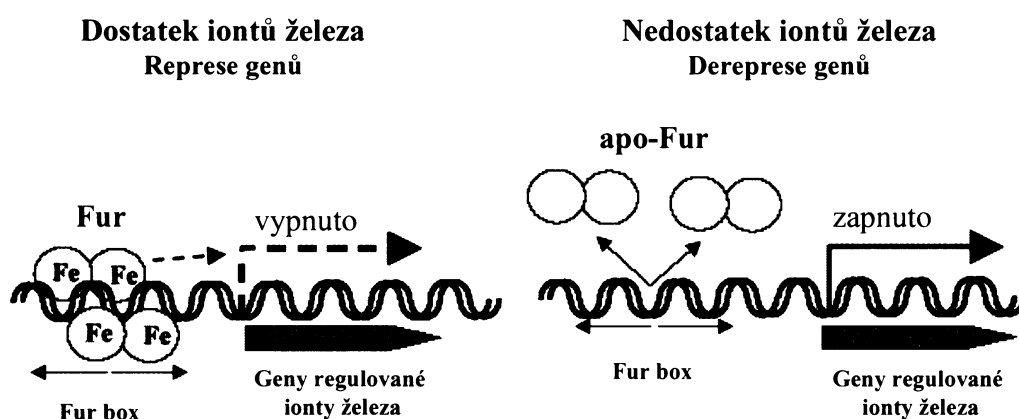
## 2.2.2 Strukturní geny podílející se na produkci a sekreci FrpC

V sekvenované části *frp* lokusu *N. meningitidis* FAM20 se kromě samotného strukturního genu pro FrpC nachází další dva otevřené čtecí rámce (Obr. 9) (103). Těsně před genem *frpC* je na stejném DNA vlákne gen *frpD* kódující lipoprotein vnější membrány (105), který nevykazuje signifikantní homologii s žádným z doposud identifikovaných a charakterizovaných proteinů, a jehož biologická funkce je stejně jako u proteinu FrpC neznámá. Geny *frpD* a *frpC* jsou pravděpodobně přepisovány ze stejného železem regulovaného promotoru a jsou odděleny pouze 17 nukleotidů dlouhou sekvencí, obsahující konzervované ribosom-vazebné místo genu *frpC*. Poslední otevřený čtecí rámec, *orf3*, se nachází na opačném DNA vlákne než *orf1-frpC* a kóduje protein o velikosti 24,9 kDa, který je homologní s proteinem IS1016-V<sub>6</sub> bakterie *Haemophilus influenzae* (106). Geny kódující jednotlivé komponenty sekrečního aparátu typu I nejsou umístěny ve *frp* lokusu nebo jeho blízkosti, ale v jiné části chromosomu (107).



Obr. 9: Schématické znázornění *frp* lokusu *N. meningitidis* FAM20. Jednotlivé geny jsou znázorněny silnými červenými a modrými šipkami. Černá tenká šipka znázorňuje železem regulovaný promotor, z něhož jsou pravděpodobně přepisovány geny *frpD* a *frpC* (93).

K produkci FrpC proteinu v kulturačním médiu dochází u *N. meningitidis* FAM20 pouze při odstranění iontů železa, tj. za limitace, do které se meningokok dostává při kolonizaci sliznice lidského hostitele (100, 103, 104, 108). Před geny *frpD-frpC* byl na základě podobnosti se sekvencemi promotorů *Neisseria sp.* a *E. coli* nalezen promotor nesoucí 16 bp, resp. 18 bp DNA sekvenci pravděpodobného Fur-specifického operátoru (Fur box) (103, 104). Předpokládá se, že k regulaci exprese *frp* genů dochází, stejně jako u jiných železem regulovaných genů *N. meningitidis* nebo jiných bakterií, prostřednictvím Fur proteinu (Ferric uptake regulator), který zde funguje jako negativní regulátor transkripce (108-110). Při nadbytku iontů železa váže jeho dvojmocnou formu a interaguje s Fur-specifickým operátorem železem regulovaných genů a blokuje tak jejich transkripci (Obr. 10). Naopak při nedostatku iontů železa k vazbě Fur proteinu k Fur boxu nedochází a geny mohou být přepisovány.



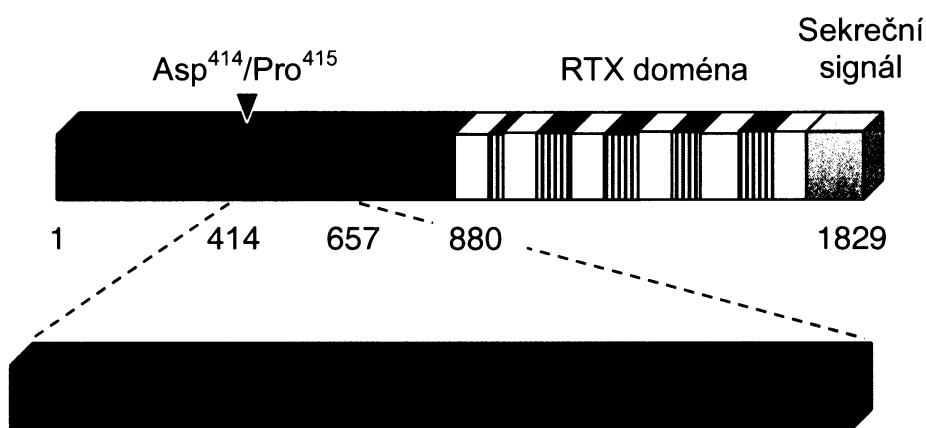
Obr. 10: Schématické znázornění negativní regulace genů prostřednictvím Fur proteinu. Při nadbytku iontů železa dochází k vazbě komplexu Fur proteinu s železnatými ionty k Fur boxu železem regulovaných genů a tím k zablokování jejich transkripce. Opačná situace nastává v případě, že je v prostředí železa nedostatek (111).

Všechny RTX proteiny jsou sekretovány sekrečním systémem typu I, který sestává ze tří komponent: z ATP-vázajícího proteinu vnitřní membrány (RtxB), kanálového proteinu vnější membrány (RtxE) a membránového periplasmatického proteinu (RtxD), který propojuje oba dva předchozí. Geny kódující proteiny RtxB, RtxD a RtxE jsou u většiny bakterií uspořádány v jednom operonu, popřípadě jsou jako operon organizovány geny pro RtxB a RtxD, přičemž gen pro RtxE je umístěn v jiné

části chromosomu. In silico prohledávání genomu *N. meningitidis* séro skupiny B však ukázalo přítomnost sekrečního systému typu I jedinečné organizace. Byly nalezeny geny kódující homology RtxB, RtxD i RtxE, přičemž *rtxB* byl nalezen na chromosomu samostatně a gen *rtxD* v těsném sousedství genu *rtxE* (107).

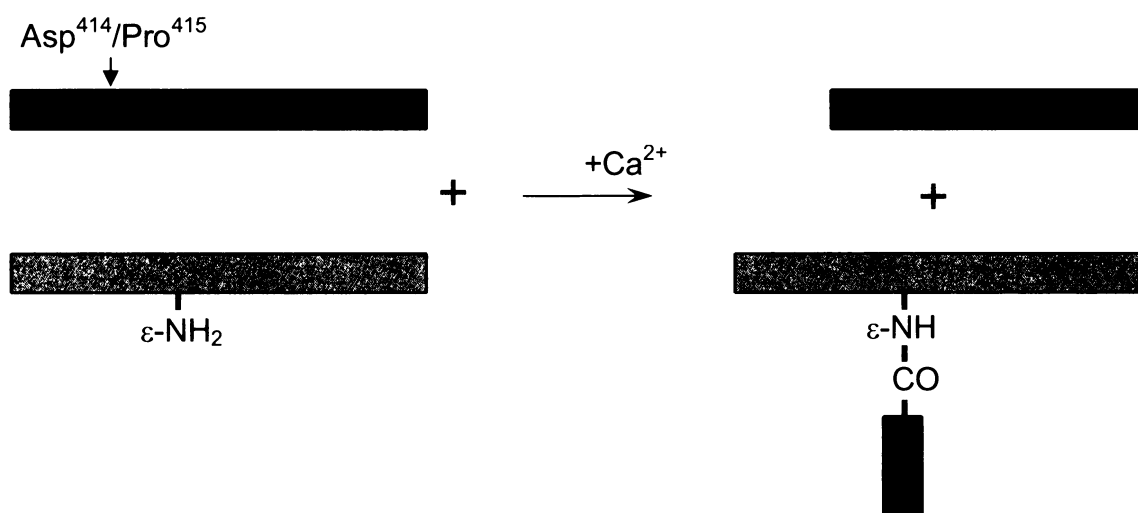
### 2.2.3 Struktura a funkce proteinu FrpC

FrpC bakterie *N. meningitidis* je 1829 aminokyselinových zbytků dlouhý protein o relativní molekulové hmotnosti 198 kDa. Ve své C-koncové části nese 43 nonapeptidových repetitivních sekvencí, s charakteristickým konsensus motivem RTX proteinů, které se podílejí na vazbě vápenatých iontů a C-koncový sekreční signál (Obr. 11) (103). Sekvence nesoucí aminokyselinové zbytky 1-400 a 658-880 N-koncové části proteinu nevykazují sekvenční homologii s žádným z doposud známých proteinů. Oblast vymezená aminokyselinovými zbytky 400 až 657 je tvořena tzv. samoštěpitelným modulem (SPM, Self-Processing Module), který je zodpovědný za autokatalytické štěpení proteinu FrpC (112). K tomu dochází v přítomnosti fyziologických koncentrací vápenatých iontů mezi aminokyselinovými zbytky Asp<sup>414</sup> a Pro<sup>415</sup>, za vzniku 45-kDa N-koncového a 150-kDa C-koncového fragmentu molekuly FrpC. Štěpení vazby Asp<sup>414</sup>/Pro<sup>415</sup> nebylo možné zablokovat žádným z nejběžněji používaných inhibitorů serinových, cysteinových nebo aspartátových proteas, stejně tak jako inhibitorů metalloproteas, což naznačuje, že by k němu mohlo docházet zcela novým mechanismem (112). Naopak, bodové mutace negativně nabitých aminokyselinových zbytků potenciálně zapojených do vazby vápenatých iontů (D499K, D510A, D521K a E532A) dramaticky snížily schopnost autokatalytického štěpení proteinu FrpC (112).



Obr. 11: **Schématické znázornění molekuly FrpC.** N-koncová část proteinu FrpC (modře) nevykazuje žádné známky podobnosti s jakýmkoliv doposud známým proteinem. Nachází se v ní takzvaný samoštěpitelný modul (SPM, zbytky 414 až 657, červeně) nezbytný pro  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentní autokatalytické štěpení proteinu FrpC mezi aminokyselinovými zbytky  $\text{Asp}^{414}$  a  $\text{Pro}^{415}$  (112). V C-koncové části molekuly se nachází repetitivní doména typická pro RTX proteiny (šedě s šrafovánými bloky) a C-koncový sekreční signál (žlutě).

Překvapivě bylo pozorováno, že v důsledku štěpení molekuly FrpC dochází k tvorbě extrémně stabilních vysokomolekulových forem rekombinantního proteinu FrpC. Tyto formy byly rozpoznávány 9D4 anti-RTX monoklonální protilátkou poukazující na přítomnost C-koncové části proteinu FrpC i anti-FLAG protilátkou M2 rozpoznávající aminokyselinovou sekvenci (tzv. FLAG tag) vloženou na N-konec proteinu FrpC. Detailní analýza pomocí hmotové spektrometrie ukázala, že se 45 kDa N-koncový fragment proteinu FrpC, vzniklý štěpením vazby  $\text{Asp}^{414}/\text{Pro}^{415}$ , může vázat přes C-terminální aspartátový zbytek k  $\epsilon$ -aminoskupině lysinového zbytku jiné molekuly FrpC a vytvářet tak kovalentní isopeptidovou vazbu (Obr. 12) (112).



Obr. 12: Schéma štěpení molekuly FrpC a následného propojení vzniklého N-koncového fragmentu s druhou molekulou proteinu kovalentní isopeptidovou vazbou. Po autokatalytickém štěpení proteinu FrpC v přítomnosti vápenatých iontů je odštěpený N-koncový fragment (modře) vázán prostřednictvím svého C-koncového aspartátového zbytku k  $\epsilon$ -aminoskupině interního lysinového zbytku jiné molekuly FrpC (zeleně), což vede ke vzniku kovalentní isopeptidové vazby (112).

Sekvence vykazující vysoký stupeň podobnosti se sekvencí SPM proteinu FrpC byly nalezeny také u některých jiných RTX proteinů, které byly objeveny poměrně nedávno a jejichž biologická funkce je stejně jako u proteinu FrpC doposud neznámá (jsou produkovány bakteriemi *Actinobacillus pleuropneumonie*, *Xylella fastidiosa*, *Ralstonia solanacearum* a *Rhizobium leguminosarum* (112, 113)). U proteinu ApxIVA bakterie *A. pleuropneumonie* bylo poté skutečně prokázáno, že je stejně jako protein FrpC autokatalyticky štěpen v přítomnosti vápenatých iontů mezi zbytky Asp<sup>414</sup> a Pro<sup>415</sup>, přičemž docházelo i v tomto případě k tvorbě stabilních vysokomolekulových forem proteinu ApxIVA (113).

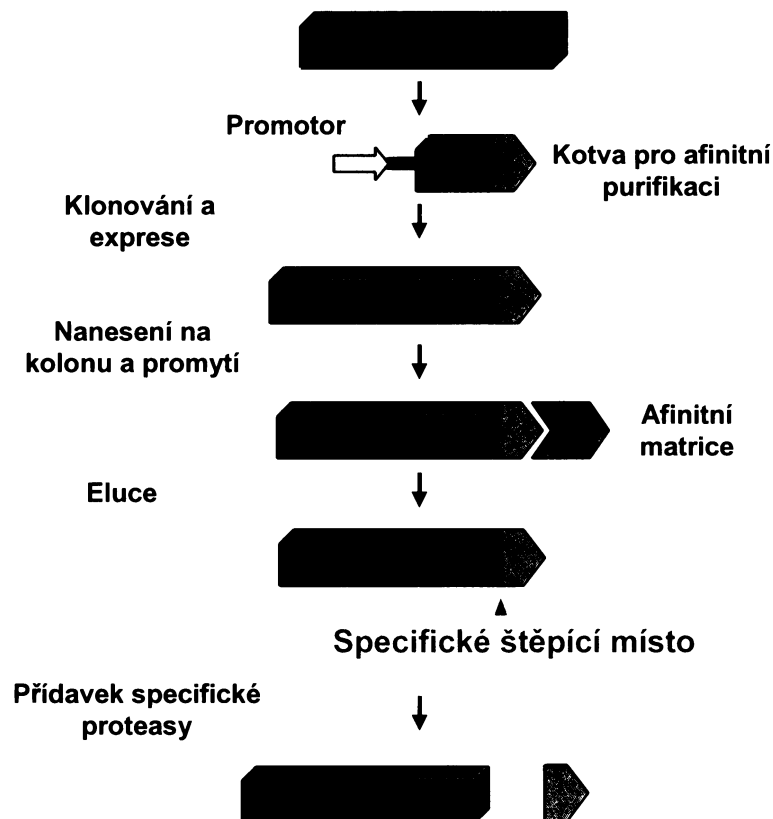
#### 2.2.4 Systémy pro purifikaci rekombinantních proteinů založené na samoštěpitelných afinitních kotvách

Jedním z možných přístupů k purifikacím rekombinantních proteinů je užití afinitních kotev určených pro purifikaci na afinitních maticích. Tyto kotvy jsou

fúzovány k jedné, popřípadě oběma koncovým částem proteinu a díky jejich afinitě k příslušné matici je možné dosáhnout velmi vysoké čistoty požadovaného proteinu už po jednokrokové purifikaci. Mezi běžně užívané afinitní kotvy patří např. poly-His-, poly-Arg-, c-myc-, FLAG-, S- nebo Strep-tag, chitin-vazebná doména, maltosu-vázající protein nebo glutathion S-transferasa. Nevýhodou systémů založených na všech těchto afinitních kotvách je fakt, že pro některé aplikace (stanovení biologické aktivity, krystalografie, produkce protilátek apod.) musí být afinitní kotva odstraněna. Pro tento účel bývá mezi afinitní kotvu a protein určený k purifikaci vkládán krátký peptid, který je rozpoznáván některým typem vysoce specifické proteasy, což umožňuje po jejím přidavku oddělení požadovaného proteinu od afinitní kotvy (Obr. 13). Tento postup s sebou ale přináší určitá omezení: (i) již jednou vypurifikovaný rekombinantní protein musí být znovu oddělen od odštěpené afinitní kotvy, nedoštěpené formy proteinu a proteasy, což vyžaduje další purifikační krok navíc, (ii) užívané proteasy, jako například faktor Xa, enterokinasa nebo trombin nejsou vždy zcela specifické a mohou rozpoznávat a štěpit peptidové vazby i v jiných místech rekombinantního proteinu, (iii) specifické štěpící místo může být v důsledku konformace fúzního proteinu nepřístupné pro štěpení danou proteasou, a (iv) použité proteasy mají většinou poměrně dlouhý poločas reakce a jejich pořizovací náklady jsou dosti vysoké.

Ve snaze vyhnout se výše uvedeným omezením, byly vyvinuty systémy, v nichž je mezi požadovaný rekombinantní protein a afinitní kotvu vložen tzv. samoštěpitelný modul (114). V případě těchto systémů nedochází ke specifickému štěpení fúzního proteinu přidavkem žádné proteasy, ale přímo samoštěpitelným modulem, který je po aktivaci schopen štěpit peptidovou vazbu mezi požadovaným rekombinantním proteinem a jím samotným. Z toho je zřejmé, že samoštěpitelný modul musí splňovat dva základní předpoklady: (i) štěpí specificky a účinně pouze peptidovou vazbu spojující rekombinantní protein s modulem samotným; (ii) štěpení je indukovatelné, což zajišťuje, že fúzní protein není rozštěpen už v produkčním organismu nebo během přípravy buněčného lyzátu, ale až v příslušném purifikačním kroku. Tyto podmínky značně zužují výběr potenciálních proteinů pro přípravu funkčních samoštěpitelných modulů a v současnosti proto existují pouze dva.



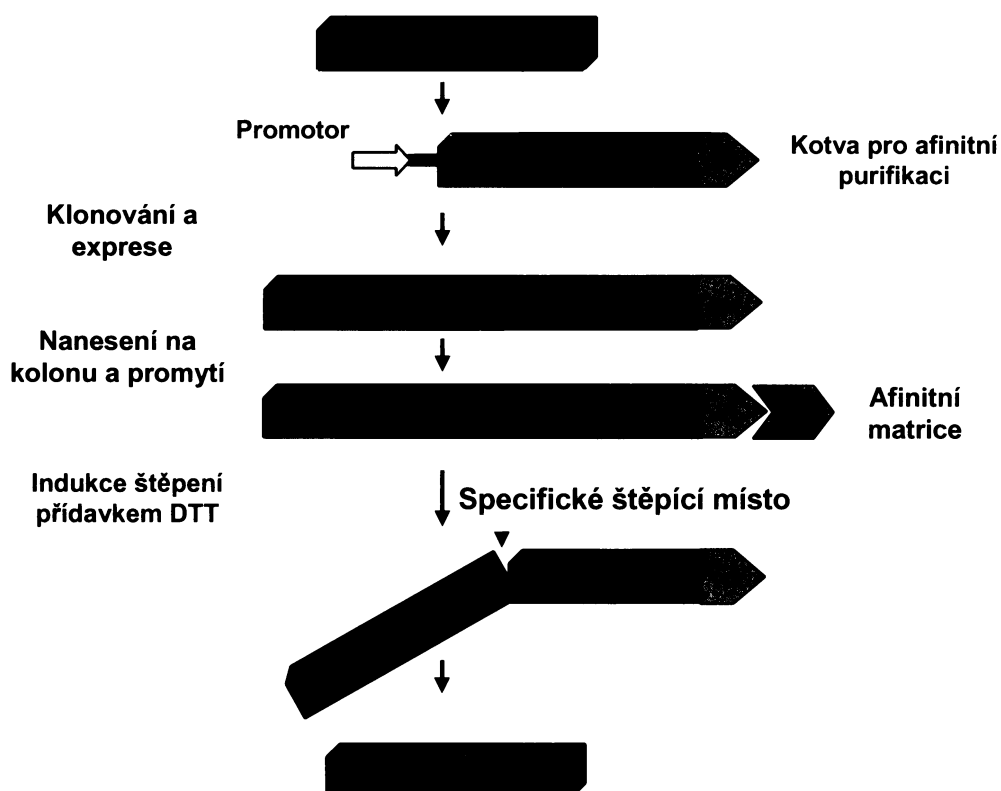


Obr. 13: **Schéma typické strategie purifikace rekombinantních proteinů pomocí afinitní chromatografie.** Gen pro protein určený k purifikaci je fúzován s DNA sekvencí pro afinitní kotvu a exprimován. Poté je připraven buněčný lyzát, který je nanesen na kolonu s příslušnou afinitní matricí, kde je fúzní protein specificky zachycen a ostatní kontaminující proteiny jsou odmyty. Fúzní protein je pak eluován a afinitní kotva odštěpena specifickou proteasou. Kotva může být odštěpena také přímo na koloně, přičemž v tomto případě zůstane navázána na matrici (v tomto případě bývá ale účinnost štěpení většinou nižší).

Jeden z nich je založený na modifikovaném VMA inteinu *Saccharomyces cerevisiae*. VMA intein, fúzovaný svým C-koncem k chitin-vázající doméně pocházející z *Bacillus circulans* (Chitin-Binding Domain, CBD) jako afinitní kotvě, je na svém N-konci fúzován s rekombinantním proteinem určeným k purifikaci (114). Během ní je exprimovaný fúzní protein vázán díky CBD kotvě na kolonu s chitinovou matricí, přičemž ostatní kontaminující proteiny jsou odstraněny. Vystavením redukčnímu působení thiolů (např. DTT,  $\beta$ -merkaptoethanol, cystein) je u inteinu aktivována štěpící aktivita a u fúzního proteinu navázaného na matrici dochází ke štěpení peptidové vazby

mezi inteinem a rekombinantním proteinem, který je následně uvolněn z matrice. Zbytek fúze, intein-CBD, zůstane pevně zachycen na matrici a nekontaminuje purifikovaný protein. Tento systém, založený na inteinu, je komerčně dostupný pod názvem “T7 IMPACT (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag) System“ od firmy New England Biolabs (Obr. 14). Druhý samoštěpitelný modul využívá katalytického jádra sortasy A bakterie *Staphylococcus aureus*. V tomto případě je sortasa A na N-konci fúzována se šesti histidinovými zbytky, umožňujícími následnou purifikaci celého fúzního proteinu na Ni-NTA agarose, a na C-konci pak s požadovaným rekombinantním proteinem (115). Indukce štěpení fúzního proteinu se v případě sortasy A provádí pomocí vápenatých iontů (115).

Jako vhodný kandidát pro výše popsanou aplikaci se jeví i samoštěpitelný modul proteinu FrpC (kap. 2.2.3). Jeho využitím pro konstrukci samoštěpitelné afinitní kotvy a následnou purifikaci se zabývá druhá část předkládané diplomové práce.



Obr. 14: Schéma purifikace rekombinantních proteinů s využitím samoštěpitelné int-CBD afinitní kotvy. Protein určený k purifikaci je N-koncovým fúzním partnerem inteinu, který na svém C-konci nese CBD kotvu pro afinitní

chromatografii. Po nanesení buněčného lyzátu na kolonu, navázání fúzního proteinu na afinitní matrici a odmytí kontaminujících proteinů je pomocí DTT indukováno štěpení vazby mezi rekombinantním proteinem a fúzí intein-CBD. Nakonec je rekombinantní protein eluován, přičemž intein-CBD zůstává přes afinitní kotvu CBD pevně vázán na matrici.

## 3 Cíle diplomové práce

### 3.1 Cíle studia proteinu ACT

RTX protein ACT bakterie *B. pertussis* slouží jako nereplikativní plasmid pro dopravu vakcinačně významných CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-buněčných epitopů do dráhy zajišťující jejich zpracování a prezentaci na molekulách MHC II., resp. MHC I. třídy APC. Cíle první části předkládané diplomové práce byly následující:

1. Zavedení nového systému pro expresi rekombinantního ACT a jeho derivátů v buňkách *E. coli* a jeho porovnání se systémem stávajícím.
2. Konstrukce plasmidů pro produkci detoxifikovaného ACT, fúzního proteinu MalE-RTX hemolysin, delečních variant MalE-RTX hemolysin a volného MalE.
3. Produkce a následná purifikace těchto rekombinantních proteinů pro použití v imunologických studiích.

### 3.2 Cíle studia proteinu FrpC

RTX protein FrpC bakterie *N. meningitidis* podléhá v přítomnosti fyziologických koncentrací vápenatých iontů specifickému autokatalytickému štěpení, kterého by mohlo být využito k purifikacím rozpustných rekombinantních proteinů. Cíle druhé části předkládané diplomové práce byly následující:

1. Konstrukce plasmidů pro produkci rekombinantních proteinů fúzovaných s SPM proteinu FrpC a afinitní kotvou, produkce a purifikace fúzních proteinů.
2. Charakterizace SPM-zprostředkovaného štěpení fúzních proteinů v roztoku.
3. Charakterizace SPM-zprostředkovaného štěpení fúzních proteinů po jejich vazbě na afinitní matici.
4. Ověření zachování enzymatických aktivit rekombinantních proteinů purifikovaných chromatografií založenou na samoštěpitelné SPM-CBD afinitní kotvě.
5. Srovnání účinnosti purifikačního systému založeného na SPM bakterie *N. meningitidis* s komerčním systémem založeným na inteinu kvasinky *S. cerevisiae*.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Chemikálie, materiál a přístrojové vybavení

#### 4.1.1 Seznam použitých chemikálií

$\lambda$ -DNA, MBI Fermentas, Vilnius, Litva

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP, INC, Hanover, USA

[2,8-<sup>3</sup>H]cAMP, INC, Hanover, USA

1-Butanol, Lachema, Brno, Česká republika

Adenosin-5'-trifosfát (ATP), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Adenosin-3',5'-(cyklický) monofosfát (cAMP), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Agarosa pro DNA elektroforesu, Promega, Madison, USA

Akrylamid, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Ampicilin, Biotika, Slovenská Lupča, Slovenská Republika

Bacto-tryptone, Oxoid, Hampshire, Anglie

Bakteriologický agar, Oxoid, Hampshire, Anglie

Bromfenolová modř, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Coomassie Blue G-250, Serva, Heidelberg, SRN

Coomassie Blue R-250, Serva, Heidelberg, SRN

Dithiothreitol (DTT), Serva, Heidelberg, SRN

Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Dihydrogenfosforečnan draselný, Lachema, Neratovice, Česká republika

Dihydrogenfosforečnan sodný (dihydrát), Lachema, Neratovice, Česká republika

5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

DEAE-Sepharosa CL-6B, Pharmacia, Praha, Česká republika

D-maltosa, Serva, Heidelberg, SRN

dNTP mix (10 mM roztok), MBI Fermentas, Vilnius, Litva

Dodecylsulfát sodný (SDS), Serva, SRN

Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného, Lachema, Neratovice, Česká republika

Ethanol, Lachema, Neratovice, Česká republika

Ethidiumbromid, Serva, Heidelberg, SRN

Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), Serva, Heidelberg, SRN  
Glycin, Serva, Heidelberg, SRN  
Glukosa, Lachema, Neratovice, Česká republika  
Glutathion, Invitrogene, San Diego, USA  
Glycerol, Lachema, Neratovice, Česká republika  
Hovězí sérový albumin (BSA), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA  
Hydrogenfosforečnan draselný, Lachema, Neratovice, Česká republika  
Hydrogenfosforečnan sodný (heptahydrát), Lachema, Neratovice, Česká republika  
Hydroxid sodný, Lachema, Neratovice, Česká republika  
Hydroxyapatit, Calbiochem, San Diego, USA  
Chitin (IMPACT™ T7 System) New England Biolabs, Ipswich, USA  
Chloramfenikol, Merck, Darmstadt, SRN  
Chlorid draselný, Lachema, Neratovice, Česká republika  
Chlorid hořečnatý, Lachema, Neratovice, Česká republika  
Chlorid sodný, Lachema, Neratovice, Česká republika  
Chlorid vápenatý, Lachema, Neratovice, Česká republika  
Chloroform, Penta, Chrudim, Česká republika  
Imidazol, Fluka, Seelze, SRN  
Isopropanol, Lachema, Neratovice, Česká republika  
Isopropyl  $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA  
Kalmodulin (CaM), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA  
Kanamycin, 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 octová, Lachema, Neratovice, Česká republika  
 $\beta$ -merkapt ethanol, Merck, Darmstadt, SRN  
Methanol, Lachema, Neratovice, Česká republika  
Močovina, Lachema, Neratovice, Česká republika  
Ni-NTA agarosa, Quigen, Hilden, SRN  
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), Serva, SRN

N,N'-metylenbis-akrylamid, Serva, Heidelberg, SRN  
Octan sodný, Lachema, Neratovice, Česká republika  
O-nitrophenyl- $\beta$ -D-galaktosid, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA  
Fenol, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA  
Phenyl-Sepharosa, Pharmacia, Praha, Česká republika  
RNAsa A, Qiagen, Hilden, SRN  
Sephadex G-25, Pharmacia, Praha, Česká republika  
Sestava na izolaci DNA, Top-Bio, Praha, Česká republika  
Sestava na stanovení LPS, Cambrex, Pittsburg, USA  
Síran hořečnatý, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA  
Standardy (High Range Molecular Weight Standards) pro určování hmotnosti proteinů pro SDS-PAGE o složení: myosin (205 kDa),  $\beta$ -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  
Uhličitan sodný, Lachema, Neratovice, Česká republika  
Tetracyklin hydrochlorid, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA  
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), Serva, Heidelberg, SRN  
Tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl), Serva, Heidelberg, SRN  
Všechny použité chemikálie dosahovaly analytické čistoty.

#### **4.1.2 Přístrojové vybavení**

Elektroforesa Mini-PROTEAN II, Bio-Rad, Herkules, USA.  
Mrazicí box (-20 °C), Zanussi, Řím, Itálie.  
Mrazicí box (-80 °C), Jouan, Paříž, Francie.  
Odstředivka Biofuge pico, Heraeus Instruments, Heidelberg, SRN.  
Odstředivka Sorvall RT6000B, Du Pont Instruments, New York, USA.  
Odstředivka Sorvall RC5C, Du Pont Instruments, New York, USA.  
Odstředivka Sorvall OTD Combi, Du Pont Instruments, New York, USA.  
pH-metr MV 870, Präzitronek, Berlin, SRN.  
Předvážky Nagema, OWA Labor, Berlin, SRN.  
Digitální váhy, Mettler, Bonn, SRN.  
Spektrofotometr SECOMAM S.250I+, ALC-SECOMAM, Nice, Francie.  
Termostatovaná třepací vodní lázeň typ 357, Elpan, Varšava, Polsko.

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.

### 4.1.3 Použité restrikční endonukleasy

Tab. 1: Seznam použitých restrikčních endonukleas

Enzym	Zásahové místo	Výrobce	Vhodný reakční NEB pufr	Reakční teplota (°C)	Vyžaduje 0,01% BSA
BamH I	G/ATCC	NEB, USA	2	37	ano
BspH I	T/CATGA	NEB, USA	2,4	37	ne
BsrG I	T/GTACA	NEB, USA	2, 4	37	ano
BstB I	TT/CGAA	NEB, USA	4	65	ne
EcoR I	G/AATTC	NEB, USA	1, 2, 3, 4	37	ne
EcoR V	GAT/ATC	NEB, USA	3	37	ano
Hind III	A/AGCTT	NEB, USA	2	37	ne
Kpn I	GGTAC/C	NEB, USA	1	37	ano
Mlu I	A/CGCGT	NEB, USA	3	37	ne
Msc I	TGG/CCA	NEB, USA	4	37	ne
Nco I	C/CATGG	NEB, USA	1, 2, 3, 4	37	ne
Nde I	CA/TATG	NEB, USA	2,4	37	ne
Nhe I	G/CTAGC	NEB, USA	1,2,4	37	ano
Pst I	CTGCA/G	NEB, USA	3	37	ano
Sal I	G/TCGAC	NEB, USA	3	37	ano
Sma I	CCC/GGG	NEB, USA	4	25	ne
Spe I	A/CTAGT	NEB, USA	2	37	ano
Xba I	T/CTAGA	NEB, USA	2	37	ano
Xho I	C/TCGAG	NEB, USA	2, 3, 4	37	ano



#### 4.1.4 Ostatní enzymy

- Alkalická fosfatasa (SAP), MBI Fermentas, Vilnius, Litva
- Pankreatická ribonukleasa (RNasa), MBI Fermentas, Vilnius, Litva
- T4 DNA-ligasa, MBI Fermentas, Vilnius, Litva - dodávaný s T4 DNA ligačním pufrům (10 x koncentrovaný, pH 7,5, 660 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 10 mM ATP)
- T4 DNA polymerasa, New England Biolabs, Ipswich, USA
- Phusion polymerasa (Top-Bio, Praha, Česká republika) s kompletním pufrům (10 x koncentrovaný, pH 8,8, 100 mM KCl, 200 mM Tris-HCl, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 1% Triton X-100)

#### 4.1.5 Použité roztoky a pufrы

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

**NEB pufr 1** (10 x koncentrovaný): pH 7,0

Bis Tris Propan-HCl ..... 10 mmol/l  
MgCl<sub>2</sub>..... 10 mmol/l  
DTT..... 10 mmol/l

**NEB pufr 2** (10 x koncentrovaný): pH 7,9

Tris-HCl.....100 mmol/l  
MgCl<sub>2</sub>.....100 mmol/l  
NaCl.....500 mmol/l  
DTT .....10 mmol/l

**NEB pufr 3** (10 x koncentrovaný): pH 7,9

Tris-HCl.....500 mmol/l  
MgCl<sub>2</sub>.....100 mmol/l  
NaCl.....1000 mmol/l  
DTT .....10 mmol/l

**NEB pufr 4 (10 x koncentrovaný):** pH 7,9

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:**

**TE pufr:** pH 8,0

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

EDTA.....1 mmol/l

**TBE pufr:** pH 8,3

Tris-borát .....90 mmol/l

EDTA.....2 mmol/l

**TN pufr (Ni-NTA):** pH 8,0

Tris-HCl.....50 mmol/l

NaCl.....300 mmol/l

**TNE pufr (Amylosa, Chitin):** pH 7,4

Tris-HCl.....50 mmol/l

NaCl.....150 mmol/l

EDTA.....1 mmol/l

**UP pufr:** pH 7,5

Močovina .....8 mol/l

Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.....43 mmol/l

**TU pufr:** pH 8,0

Močovina.....8 mol/l

Tris-HCl.....50 mmol/l

**TUE pufr:** pH 8,0

Močovina.....4 mol/l

Tris-HCl.....50 mmol/l

EDTA.....2 mmol/l

**TUN-A pufr:** pH 8,0

Močovina.....8 mol/l

Tris-HCl.....50 mmol/l

NaCl.....120 mmol/l

**TUN-B pufr:** pH 8,0

Močovina.....8 mol/l

Tris-HCl.....50 mmol/l

NaCl.....200 mmol/l

**TI pufr:** pH 8,0

Tris-HCl.....50 mmol/l

Isopropanol ..... 60 %(v/v)

**BFB (5 x koncentrovaný) :**

Bromfenolová modř.....0,25 (w/v)

Glycerol ..... 40% (v/v)

**Roztok I:** pH 8,0

Glukosa.....50 mmol/l

Tris-HCl.....25 mmol/l

EDTA.....10 mmol/l

Steriluje 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.

**Činidlo Bradfordové:**

Coomassie Blue R250.. .0,01% (w/v)  
Ethanol..... 4,7% ( v/v )  
H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.....8,7% (v/v)

**PBS**

pH 7,4

NaCl.....138 mmol/l  
KCl.....3 mmol/l  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....12 mmol/l  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....2 mmol/l

**PBS/E**

pH 7,4

NaCl.....138 mmol/l  
KCl.....3 mmol/l  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....12 mmol/l  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....2 mmol/l  
EDTA.....1 mmol/l

**Z pufr:**

pH 7.0

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....0,06 mol/l  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0,04 mol/l

KCl.....0,01 mol/l  
MgSO<sub>4</sub>... ..1 mmol/l  
β-merkptoethanol... ..0,05 mol/l

Skladujeme při 4 °C.

**30% roztok akrylamidu pro SDS-PAGE:**

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

**Zaostřovací 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

**Rozdělovací 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 µl  
20% APS.....12,5 µl  
TEMED ..... 12,5 µl

**Rozdělovací gel pro SDS-PAGE 10%:**

pH 8,8

30% roztok akrylamidu .. ..1,66 ml  
Destilovaná voda ..... 1,38 ml  
1 M Tris-HCl pufr (pH 8,8) .... 1,87 ml  
10% SDS.....50 µl  
20% APS.....12,5 µl  
TEMED ..... 12,5 µl

**Vzorkový pufr pro SDS-PAGE:**

pH 6,8

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

**Barvicí roztok pro SDS-PAGE:**

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

**Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE:**

Methanol.....250 ml  
Voda.....650 ml  
Kyselina octová ..... 100 ml

**Uchovávací roztok pro SDS-PAGE:**

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

**Tris-glycinový pufr:**

pH 8,3

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

## RM pufr

4 mg 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoové kyseliny) rozpustíme v 1 ml 1 M Tris pH 7,8, přidáme 200 µl 5 mM acetyl-CoA a doplníme deionizovanou vodou na konečný objem 10 ml.

## Substrát pro stanovení aktivity chloramfenikol acetyltransferasy

5 mM roztok chloramfenikolu připravíme rozpuštěním 16 mg pevného chloramfenikolu v 10 ml ethanolu. Skladujeme při -20 °C.

### 4.1.6 Syntetické oligonukleotidy

Oligonukleotidy byly dodány jako jednovláknová DNA v lyofilizované formě (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR). Pro následné použití ke vkládání do plasmidové DNA byly rozpuštěny v TE pufru na výslednou koncentraci 1 µg/µl. Směs dvou komplementárních oligonukleotidů byla inkubována při teplotě 70 °C po dobu 10 minut a poté pozvolna ochlazená na pokojovou teplotu. Tímto způsobem byly oligonukleotidy převedeny na dvouvláknovou formu DNA. Pro použití k sekvenaci DNA byly oligonukleotidy rozpuštěny v TE pufru na výslednou koncentraci 10 pmol/µl.

Tab. 2: Použité oligonukleotidy

<b>Oligonukleotidy pro amplifikaci genu pro MalE</b>	
MalE_For	5'- GCG CAT ATG AAA ATC GAA GAA GGT AAA CTG -3'
MalE_Back	5'- CGC GTT CGA ACC CTT GGT GAT ACG AGT CTG C -3'
<b>Oligonukleotidy pro klonování <i>malE</i> pro přípravu pT7CT7ACT1/E5Δ374-647</b>	
BstNcoDel_For	5'- CGA AGG G -3'
BstNcoDel_Back	5'- CAT GCC CTT -3'
<b>Oligonukleotidy nesoucí zásahové místo pro restrikční endonukleasu BstB I umožňující konstrukci plasmidu pET28-<i>malE</i>-C-His</b>	
HindXhoAdap_For	5'- AGC TTT CGA ATG -3'
HindXhoAdap_Back	5'- TCG ACA TTC GAA -3'
<b>Oligonukleotidy nesoucí sekvenci kódující histidinovou kotvu (6×His)</b>	

6×His_For	5' - TAT GCA TCA CCA TCA CCA TCA CAC GCG -3'
6×His_Back	5' - TA CGC GTG TGA TGG TGA TGG TGA TGC A-3'
<b>Oligonukleotidy nesoucí sekvenci kódující STOP kodon</b>	
STOP_For	5' - CTA GGA TCA TGA -3'
STOP_Back	5' - C TAG TCA TGA TC -3'
<b>Oligonukleotidy nesoucí zásahové místo pro restrikční endonukleasu Nhe I umožňující klonování genu pro GST z plasmidu pET42b</b>	
GST_For	5' - CTA GCG ACC CGC TAG CAC -3'
GST_Back	5' - G TAC GTG CTA GCG GGT CG -3'
<b>Oligonukleotidy pro amplifikaci genu pro CAT</b>	
CAT_For	5' - CGC GCA TAT GGA GAA AAA AAT CAC T -3'
CAT_Back	5' - GGG CTA GCG GGT CCG CCC CGC CCT GCC ACT C-3'
<b>Oligonukleotidy pro amplifikaci genu pro LacZ</b>	
LacZ_For	5' - CCG GTA CCA TGA TAG ATC CCG TCG TT -3'
LacZ_Back	5' -G GGC TAG CGG GTC ATG GTG ATG GTG ATG ATG-3'

#### 4.1.7 Kultivační média

##### 4.1.7.1 Tekutá kultivační média

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

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

###### MDO médium:

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 1 g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 3 g  
NH<sub>4</sub>Cl ..... 2 g  
Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ..... 0,5 g  
Thiamin ..... 10 mg  
Kvasničný extrakt ..... 20 mg



Glycerol ..... 20 mg

Deionizovaná voda ..... do 1000 ml

Upraví se na pH 7,0 pomocí 5 mol/l NaOH. Steriluje se autoklárováním (0,12 MPa, 20 minut).

#### **Médium s tetracyklinem a ampicilinem :**

Připraví se příslušné médium (LB médium nebo MDO médium) (kap. 4.1.7.1). Po sterilaci a vychladnutí se k médiu přidá tetracyklin do výsledné koncentrace 12,5 µg/ml a ampicilin do výsledné koncentrace 150 µg/ml.

#### **Médium s ampicilinem:**

Připraví se médium (LB médium nebo MDO médium) (kap. 4.1.7.1). Po sterilaci a vychladnutí se k médiu přidá ampicilin do výsledné koncentrace 150 µg/ml.

#### **Médium s kanamycinem:**

Připraví se příslušné médium (LB médium nebo MDO médium) (kap. 4.1.7.1). Po sterilaci a vychladnutí se k médiu přidá kanamycin do výsledné koncentrace 60 µg/ml.

Takto připravená média se uchovávají při 4 °C.

### **4.1.7.2 Tuhá kultivační média**

#### **LB médium s tetracyklinem a ampicilinem :**

Připraví se LB médium (kap. 4.1.7.1) a před sterilací se do média přidá 18 g/l bakteriologického agaru a po sterilaci a vychladnutí tetracyklin do výsledné koncentrace 12,5 µg/ml a ampicilin do výsledné koncentrace 150 µg/ml.

#### **LB médium s ampicilinem:**

Připraví se LB médium (kap. 4.1.7.1) a před sterilací se do média přidá 18 g/l bakteriologického agaru a po sterilaci a vychladnutí se k médiu přidá ampicilin do výsledné koncentrace 150 µg/ml.

### **LB médium s kanamycinem:**

Připraví se LB médium (kap. 4.1.7.1) a před sterilací se do média přidá 18 g/l bakteriologického agaru a po sterilaci a vychladnutí se k médiu přidá kanamycin do výsledné koncentrace 60 µg/ml.

### **4.1.8 Plasmidy**

**pAc5.1/V5-His/lacZ** (Invitrogene, USA) nese gen pro β-galaktosidasu, který je ve fázi čtení se sekvencí kódující histidinovou kotvu a gen pro rezistenci k ampicilinu.

**pET2** (116) nese gen pro chloramfenikol acetyltransferasu a gen pro rezistenci ke kanamycinu.

**pET28b** (Novagen, USA) nese gen pro rezistenci ke kanamycinu a sekvenci pro histidinovou kotvu.

**pET42b** (Novagen, USA) nese gen pro glutathion-S-transferasu a gen pro rezistenci ke kanamycinu.

**pMM100** (P. Šebo) je plasmid nesoucí gen pro rezistenci k tetracyklinu a gen kódující LacI<sup>q</sup> represor.

**pT7CACT1** (117) nese gen *cyaA* kódující ACT a gen *cyaC* kódující protein nezbytný pro posttranslační modifikaci ACT mastnou kyselinou. Oba geny jsou pod kontrolou inducibilního *lac* promotoru. Tento plasmid nese gen pro rezistenci k ampicilinu.

**pT7CT7ACT1** (70) nese gen *cyaA* kódující ACT a gen *cyaC* kódující protein nezbytný pro posttranslační modifikaci ACT mastnou kyselinou. Oba geny jsou pod kontrolou inducibilního *lac* promotoru. Tento plasmid nese gen pro rezistenci k ampicilinu.

**pT7CT7ACT1/BstNheAdap** (R. Osička, nepublikovaný konstrukt)

**pT7CT7ACT1/SmaBstAdap** (R. Osička, nepublikovaný konstrukt)

**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<sup>TM</sup> T7 systému na chitinové koloně.

**pTYB2-*frpC-int-CBD*** (R. Osička, nepublikovaný konstrukt)

**pTYB2-MCS-SPM-CBD** (R. Osička, nepublikovaný konstrukt)

**pTYB2-MCS-BstAdap-SPM-CBD** (R. Osička, nepublikovaný konstrukt)

#### **4.1.9 Bakteriální kmeny**

Bakteriální kmen *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, USA) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI<sup>q</sup> ZΔM15Tn10(Tet<sup>r</sup>)]* byl používán pro manipulaci plasmidových DNA a expresi ACT.

Bakteriální kmen *E. coli* BL21(λDE3) (Novagen, USA) *F<sup>r</sup> ompT gal[dcmlon] hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>; an *E. coli* B strain)* s DE3, λ profágem nesoucím gen pro T7 RNA-polymerasu byl používán pro expresi proteinu Male a fúzních proteinů na bázi SPM proteinu FrpC bakterie *Neisseria meningitidis*.

## **4.2 Metody a pracovní postupy**

### **4.2.1 Uchovávání bakteriálních kmenů**

Kmeny *E. coli* byly krátkodobě uchovávány na tuhém LB médiu s příslušným antibiotikem. Dlouhodobě byly uchovávány ve 40% glycerolu při teplotě – 80 °C. Bakteriální kmeny vzniklé transformací plasmidové DNA do kompetentních buněk *E. coli* (kap. 4.2.4) byly krátkodobě uchovávány na tuhém médiu s příslušným antibiotikem při 4 °C.

### **4.2.2 Izolace chromosomální DNA *E. coli* K12**

Narostlá bakteriální 50 ml kultura buněk *E. coli* K12 byla centrifugována (12000g 4 °C, 1 minuta). Supernatant byl odlit a pelet resuspendován v 0,8 ml TNE pufru. Následně bylo přidáno 50 μl 10% SDS a 5 μl RNasy A do výsledné koncentrace 10 mg/ml. Směs byla inkubována po dobu 30 minut při teplotě 42 °C, aby došlo k lýzi buněk a štěpení RNA v nich přítomné. Po uplynutí této doby bylo do směsi přidáno postupně 0,5 ml fenolu a 0,5 ml chloroformu. Směs byla důkladně protřepána a centrifugována (12000g, 4 °C, 5 minut). Horní vodná fáze byla odebrána a k ní bylo přidáno 70 μl 3 mol/l octanu sodného a v dalším kroku 700 μl isopropanolu. Směs byla ponechána 15 minut na ledu a následně centrifugována (12000g, 4 °C, 10 minut). Supernatant byl odlit a pelet resuspendován ve 300 μl TE pufru. Kroky následující od

přídavku octanu sodného byly zopakovány ještě jednou. Výsledný pelet byl opláchnut přídavkem 1 ml 70% ethanolu, ethanol odlit a pelet po odpaření ethanolu resuspendován ve 100  $\mu$ l TE pufru. Koncentrace získané DNA byla měřena spektrofotometricky a její čistota stanovena z poměru  $OD_{260}/OD_{280}$ .

### 4.2.3 Příprava kompetentních buněk *Escherichia coli*

Na tuhé LB médium byla nanášena suspenze 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 přehřáté na 37 °C. Buňky byly kultivovány při 37 °C za intenzivního třepání a během kultivace byla měřena optická densita při vlnové délce 600 nm ( $OD_{600}$ ). Jakmile dosáhla hodnoty 0,3-0,4 byla kultura prudce ochlazena na 4 °C a centrifugována (6000g, 4 °C, 10 minut). Sediment byl resuspendován v 10 ml sterilního 0,1 M  $CaCl_2$  o teplotě 4 °C. Po inkubaci (4 °C, 15 minut) byla buněčná suspenze centrifugována (6000g, 4 °C, 10 minut) a sediment byl opět resuspendován ve 2 ml 0,1 mol/l  $CaCl_2$  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.

### 4.2.4 Transformace plasmidové DNA do kompetentních buněk

K 200  $\mu$ l suspenze kompetentních buněk byl přidán 1  $\mu$ l plasmidové DNA získané minipreparativní izolací (kap. 4.2.5.1), obsah byl šetrně, ale důkladně zamíchán. V případě, že byla transformována DNA získaná ligací (kap. 4.2.6.4), bylo ke stejnému množství kompetentních buněk přidáno 15  $\mu$ l ligační směsi DNA. Směs byla inkubována (4 °C, 30 minut) a následně přenesena na 5 minut do vodní lázně o teplotě 37 °C a poté ochlazena v ledu. Po přidání 1 ml tekutého LB média byla kultura inkubována (37 °C, 60 minut). Během této doby se plasmid uvnitř transformovaných buněk replikuje a zároveň dochází k produkci určitého množství  $\beta$ -laktamasy, popřípadě jiného produktu genu pro rezistenci k určitému antibiotiku. V závěru celého procesu bylo vyseto 50-200  $\mu$ l suspenze na tuhé LB médium s příslušným antibiotikem. Buňky byly inkubovány (37 °C, 12-16 hodin).

## **4.2.5 Izolace plasmidové DNA**

### **4.2.5.1 Minipreparace plasmidové DNA**

Jednou čerstvě narostlou bakteriální kolonií byly zaočkovány 2 ml LB média s příslušným antibiotikem a byly kultivovány za intenzivního třepání (37 °C, 12-14 hodin). Bakteriální kultura byla centrifugována (12000g, 20 °C, 30 sekund) a sediment byl resuspendován ve 100 µl roztoku I, buňky byly lyzovány přídatkem 200 µl roztoku II, šetrně promíchány a inkubovány v ledu. K lyzovaným buňkám bylo přidáno 150 µl roztoku III a následně byla směs promíchána a inkubována (4 °C, 15 minut). Centrifugací (12000g, 4 °C, 15 minut) byly odstraněny zbytky buněčných struktur, vysrážené proteiny a chromosomální DNA. Supernatant byl převeden do nové mikrozkušavky a plasmidová DNA byla sražena stejným objemem isopropanolu (4 °C, 10 minut). Po centrifugaci (12000g, 4 °C, 15 minut) byl pelet sražené DNA promyt 500 µl 70% ethanolu. Sediment byl vysušen na vzduchu 10 minut a následně rozpuštěn ve 40 µl TE pufru pH 8,0 s termostabilní pankreatickou RNasou (20 µg/ml). Směs byla inkubována (70 °C, 30 minut) a plasmidová DNA byla dlouhodobě uchovávána při teplotě -20 °C.

### **4.2.5.2 Midipreparace plasmidové DNA**

Bakteriální kolonií po transformaci požadovanou plasmidovou DNA bylo zaočkováno 50 ml LB média s příslušným antibiotikem a kultivováno (37 °C, 10 hodin). Centrifugací (6000g, 4 °C, 10 minut) byly odděleny bakteriální buňky a resuspendovány v 1 ml roztoku I. Suspenze buněk byla rozdělena do tří mikrozkušavek na tři stejné objemové díly. Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 0,5 ml roztoku II a promícháno pomalou inverzí. Vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě 5 minut. Poté bylo přidáno 0,5 ml roztoku III a obsah byl intenzivně promíchán. Centrifugací (12000g, 20 °C, 7 minut) byly odstraněny vysrážené proteiny, chromosomální DNA a ostatní buněčné struktury. Supernatant byl převeden do 10 ml zkumavky a smíchán s 3,5 ml DNA vazebného pufru. Směs byla postupně nanesena na dvě minikolonky s křemičitými partikulami umístěné na vakuové odsávačce a byla prosáta za mírného podtlaku. Minikolonky s navázanou plasmidovou DNA byly promyty 2×1 ml DNA promývacího pufru, přeneseny do nové mikrozkušavky a centrifugací byly odstraněny zbytky promývacího pufru (12000g, 20 °C, 2 minuty). Plasmidová DNA

byla eluována z náplně minikolonky přidavkem 50  $\mu\text{l}$  sterilní vody, která byla přehřátá na 50 °C. Plasmidová DNA připravená tímto způsobem byla vysoce koncentrovaná a uchovávala se při -20 °C. DNA vazebný pufr, promývací pufr a vazebné křemičité partikule jsou součástí komerčně dodávaného kitu pro izolaci plasmidové DNA (Top Bio, Praha, ČR).

## **4.2.6 Manipulace s plasmidovou DNA**

### **4.2.6.1 Štěpení plasmidové DNA restrikčními endonukleasami**

Plasmidová DNA získaná minipreparativní izolací (5  $\mu\text{l}$ ) (kap. 4.2.5.1) nebo plasmidová DNA získaná midipreparativní izolací (1  $\mu\text{l}$ ) (kap. 4.2.5.2), v obou případech odpovídá toto množství 0,5  $\mu\text{g}$  DNA, byla smíchána s 2  $\mu\text{l}$  10 x koncentrovaného příslušného pufru a 2  $\mu\text{l}$  10 x koncentrovaného BSA, vše podle optima dané endonukleasy (kap. 4.1.3, Tab. 1). Objem byl doplněn na 20  $\mu\text{l}$  deionizovanou vodou a dobře promíchán. K promíchané směsi byly přidány 1 až 2 U požadované restrikční endonukleasy a směs byla inkubována 2 hodiny ve vodní lázni o vhodné teplotě (kap. 4.1.3, Tab. 1). V případě potřeby byly enzymy s doporučenou reakční teplotou 37 °C inaktivovány zahřátím na 70 °C po dobu 20 minut.

### **4.2.6.2 Defosforylace 5'-konců lineární plasmidové DNA**

Do mikrozkušavky obsahující 10  $\mu\text{l}$  naštěpené plasmidové DNA (kap. 4.2.6.1) byl přidán 1  $\mu\text{l}$  10 x koncentrovaného NEB 2 pufru a objem byl doplněn deionizovanou vodou do 19  $\mu\text{l}$ . Po promíchání byl přidán 1  $\mu\text{l}$  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.

### **4.2.6.3 Zatupení kohesních konců fragmentů plasmidové DNA**

K 20  $\mu\text{l}$  směsi plasmidové DNA, která byla štěpena restrikčními endonukleasami (kap. 4.2.6.1) byl přidán 1  $\mu\text{l}$  10 x koncentrovaného NEB pufru (T4 DNA polymerasa je aktivní ve všech čtyřech standardních NEB pufrech), 0,5  $\mu\text{l}$  4 mmol/l dNTP, 7,5  $\mu\text{l}$  deionizované vody a 1  $\mu\text{l}$  T4 DNA polymerasy. Po promíchání byla směs inkubována 30 minut při 12 °C. T4 DNA polymerasa byla inaktivována inkubací 10 minut při 75 °C.

#### 4.2.6.4 Ligace fragmentů DNA

Štěpený plasmid byl smíchán s vkládaným DNA fragmentem (oba většinou purifikovány z agarosového gelu) nebo syntetickým oligonukleotidem v molárním poměru 1:10, 3  $\mu\text{l}$  10 x koncentrovaného ligačního pufru (660 mmol/l Tris-HCl (pH 7,5), 50 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ , 100 mmol/l dithiotreitol, 10 mmol/l ATP) a deionizovanou vodou, která byla doplněna do 29  $\mu\text{l}$ . Po promíchání byl přidán 1  $\mu\text{l}$  T4 DNA-ligasy (5 U) a reakční směs se nechala inkubovat 2 hodiny při pokojové teplotě při ligaci kohesních konců DNA nebo 12 až 16 hodin při ligaci zatupených konců DNA.

#### 4.2.6.5 Amplifikace fragmentů plasmidové DNA

Do tenkostěnné mikrozkušavky určené pro amplifikaci pomocí metody PCR (Polymerase Chain Reaction) bylo k 1  $\mu\text{l}$  templátové DNA (200 ng/ $\mu\text{l}$ ) přidáno 5  $\mu\text{l}$  10 x koncentrovaného kompletního pufru. Následně bylo přidáno 1,5  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{mol/l}$  primeru I a 1,5  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{mol/l}$  primeru II, které byly rozpuštěny v TE pufru. Dále bylo přidáno 5  $\mu\text{l}$  2 mmol/l dNTP, 35,5  $\mu\text{l}$  deionizované vody a 0,5  $\mu\text{l}$  Phusion DNA polymerasy. Templátová DNA byla denaturována zahřátím na 95 °C po dobu 5 minut, dále následoval nastavený cyklus, který se opakoval celkem 30-krát: 15 sekund při teplotě 95 °C, 30 sekund při teplotě 54 °C a 72 °C po dobu 1 minuty pro amplifikaci genu pro MalE. Pro amplifikaci genu pro CAT, resp. LacZ, probíhala polymerasová řetězová reakce podle následujícího schématu: 98 °C po dobu 30 sekund a poté byl 30-krát opakován cyklus: 98 °C po dobu 10 sekund, 54 °C po dobu 30 sekund a 72 °C po dobu 30 sekund pro CAT, resp. 90 sekund pro LacZ. Po proběhnutí všech 30 cyklů byly zkumavky s reakční směsí ponechány 10 minut v PCR přístroji při teplotě 72 °C a poté byl jejich obsah ochlazen na teplotu 4 °C a podle potřeby buď okamžitě zpracován, či zamražen při teplotě -20 °C.

#### 4.2.6.6 Elektroforesa DNA fragmentů v agarosovém gelu

Koncentrace agarosového gelu byla zvolena podle velikosti dělených fragmentů, přičemž ve většině případů byl používán 0,6% (w/v) a 1% (w/v) agarosový gel obsahující ethidiumbromid o výsledné koncentraci 0,5  $\mu\text{g/ml}$ . Příprava suspenze: vařením až do úplného rozpuštění agarosy a ochlazením na teplotu 50 °C. Poté byla

takto připravená směs nalita do obdélníkové formy z plexiskla asi do výšky 0,5-1 cm. Výška hřebínku pro nanášení vzorků byla nastavena tak, aby dno jamky bylo ode dna formy vzdáleno asi 0,2-0,3 cm. Gel byl vložen do aparatury pro agarosovou elektroforesu a převrstven TBE pufrem do výšky asi 2 mm nad gel. Do jamek byl nanesen vzorek DNA a standard k určování velikostí DNA o známých velikostech fragmentů ( $\lambda$  DNA štěpená restriční endonukleasou Pst I). Zařízení bylo zakryto krytem z plexiskla a na elektrody bylo vloženo napětí o takové velikosti, aby vytvořený potenciálový gradient činil 5 V/cm. Elektroforesa probíhala většinou po dobu 2 hodin, poté byla aparatura odpojena od zdroje napětí, odebrán kryt a vyjmut gel. Rozdělení jednotlivých DNA fragmentů bylo pozorováno při UV světle. U všech gelů byl pořízen elektroforeogram pomocí CCD kamery.

#### **4.2.6.7 Izolace DNA fragmentů z agarosového gelu**

Fragment DNA byl vyříznut z agarosového gelu a přenesen do mikrozkuhavky, do které bylo přidáno 900  $\mu$ l DNA vazebného pufru. Takto připravený vzorek byl inkubován při 55 °C 10 minut do úplného rozpuštění agarosy. Směs byla nanesena na minikolonku s křemičitými partikulami a vystavena mírnému podtlaku. Navázaná plasmidová DNA byla dvakrát promyta jedním mililitrem promývacího roztoku a přebytek tohoto roztoku byl odstraněn centrifugací (12000g, 20 °C, 2 min). Plasmidová DNA byla uvolněna z náplně minikolonky přidávkem 40  $\mu$ l sterilní vody, která byla přehřátá na 50 °C. Získané DNA fragmenty byly uchovávány při teplotě -20 °C.

#### **4.2.7 Produkce proteinů ve 2 ml kulturách**

Bakterie *E. coli* XL1-Blue, *E. coli* BL21/pMM100, resp. BL21( $\lambda$ DE3)) byly transformovány (kap. 4.2.4) plasmidem určeným k expresi požadovaného proteinu a inkubovány na LB plotnách s příslušným antibiotikem. Druhý den byly jednou kolonií zaočkovány 2 ml LB média s příslušným antibiotikem a buňky byly inkubovány přes noc ve 37 °C. Z noční kultury bylo odebráno 20  $\mu$ l suspenze bakteriálních buněk a těmi bylo 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 přidávkem IPTG o výsledné



koncentraci 1 mmol/l a kultura se nechala růst další 4 hodiny. Po uplynutí této doby byla kultura centrifugována (12000g, 4 °C, 2 minuty) a pelet byl resuspendován ve 200 µl TU pufru. Následně bylo odebráno 20 µl pro analýzu pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20).

#### **4.2.8 Sekvence plasmidové DNA**

Plasmidová DNA určená k sekvenaci byla izolována pomocí kitu NucleoSpin (Macherey-Nagel GmbH, SRN) nebo pomocí kitu QIAprep (QIAGEN GmbH, SRN). Sekvence byla provedena Sangerovou metodou kombinovanou s technikou cyklického sekvenování. Bylo použito kitu pro cyklické sekvenování (ABI PRISM Big Dye terminator ready reaction cycle sequencing kit, Applied Biosystems, USA), neznačeného primeru komplementárního k sekvenované DNA a vyhodnocení pomocí DNA sekvenátoru ABI PRISM 377 (Perkin Elmer, USA). Tato část práce byla provedena v sekvenační laboratoři MBÚ AV ČR, Praha (Dr. J. Felsberg).

#### **4.2.9 Produkce a purifikace ACT a jeho derivátů**

##### **4.2.9.1 Kultivace buněk ve fermentoru**

Kompetentní buňky *E. coli* BL21/pMM100, resp. BL21(λDE3) byly transformovány (kap. 4.2.4) příslušným plasmidem a inkubovány na tuhém LB médiu s přidavkem příslušného antibiotika po dobu 12-14 hodin při 37 °C. Následně bylo 5-6 velkými koloniemi zaočkováno 50 ml tekutého MDO média s přidavkem příslušného antibiotika a kultura byla kultivována za nepřetržitého vzdušného třepáním po dobu 10 hodin při 37 °C. Po této době bylo z takto připravené kultury zaočkováno 5 ml dvakrát 500 ml MDO média s přidavkem příslušného antibiotika a kultury byly kultivovány stejným způsobem po dobu 10 hodin při 37 °C. Médium ve fermentoru bylo připraveno sterilizací směsí tohoto složení: 5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 g NH<sub>4</sub>Cl, 2,5 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 g kvasničný extrakt, 100 g glycerolu, doplněno do 5 l deionizovanou vodou. Obě 500 ml kultury byly centrifugovány při 6000g po dobu 25 minut při 25 °C, supernatant byl odlit a pelety resuspendovány ve 25 ml čerstvého MDO média. Takto připraveným inokulem bylo zaočkováno médium ve fermentoru, do kterého bylo ještě předtím přidáno příslušné antibiotikum a 10 mM glukosa. Kultivace probíhala za stálého

vzdušnění mícháním při 30, resp. 37 °C. Dle průběhu křivek spotřeby kyslíku, přírůstu oxidu uhličitého a z výsledků měření optické density při vlnové délce 600 nm, byla provedena indukce exprese proteinu přidavkem 1 mmol/l IPTG. Poté byla kultura ponechána ještě další 4 hodiny za udržování stálé teploty a hodnoty dodávaného kyslíku. Po uplynutí této doby byla celá kultura rychle ochlazená na 4 °C, převedena do centrifugačních kyvet a centrifugována při 6000g po dobu 30 minut při 4 °C. Supernatant byl odlit, pelety resuspendovány v TNE pufru a opět stočeny (6000g, 4 °C, 10 minut). Po odstranění supernatantu byl pelet buněk zamražen při – 20 °C.

#### **4.2.9.2 Příprava močovinného extraktu ACT a jeho derivátů**

Pelet buněk po kultivaci ve fermentoru (kap. 4.2.9.1) byl resuspendován ve 20 ml TNE pufru a sonikován (4×30 sekund, 60 W, 4 °C). Po sonikaci byly zbývající intaktní buňky odstraněny centrifugací (6000g, 4 °C, 5 minut), supernatant byl přenesen do nové centrifugační zkumavky a centrifugován (26000g, 4 °C, 15 minut). Supernatant byl odstraněn, opatrným odmýváním TEU pufrem byla z peletu obsahujícího inkluze a membrány odstraněna membránová frakce. Frakce inkluzí byla promyta v deionizované vodě a celý obsah zkumavky byl centrifugován (26000g, 4 °C, 10 minut). Supernatant byl znovu odlit a k vytvořenému peletu bylo přisypáno 4,8 g pevné močoviny a přidáno 6 ml 50 mmol/l roztoku Tris-HCl (pH 8,0). Obsah zkumavky byl šetrně promíchán a nadále po dobu 30 minut promícháván pomalou inverzí. Poté byl obsah zkumavky centrifugován (26000g, 4 °C, 30 minut) a supernatant obsahující denaturovaný ACT nebo jeho deriváty byl převeden do nových zkumavek a uchováván při teplotě -20 °C.

#### **4.2.9.3 Purifikace proteinů iontoměničovou chromatografií na DEAE-Sepharose**

Chromatografická kolona byla naplněna 10 ml DEAE-Sepharosy a propláchnuta deionizovanou vodou, aby došlo k odstranění ethanolu, ve kterém byla matrice uchovávána. Kolona byla ekvilibrována 8-násobkem objemu náplně kolony roztokem TUN-A. Močovinný extrakt připravený k purifikaci (kap. 4.2.9.2) byl centrifugován pro odstranění koloidů (16000g, 4 °C, 30 minut) a byla v něm upravena koncentrace NaCl na výslednou hodnotu 50 mmol/l. Po nanesení močovinného extraktu na kolonu byly kontaminující proteiny odstraněny pomocí TUN-A pufru. Pokud bylo potřeba odstranit LPS, bylo použito odmývání 60% isopropanolem.

Navázaný toxin byl z kolony eluován po 1 ml frakcích pomocí roztoku TUN-B. Množství proteinu bylo měřeno v každé frakci orientačním testem podle Bradfordové (10  $\mu$ l frakce a 90  $\mu$ l činidla Bradfordové). Čistota a celistvost proteinu v jednotlivých frakcích byla analyzována pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20).

#### **4.2.9.4 Purifikace proteinů na hydroxyapatitu**

Předem připravená matrice (hydroxyapatit v množství 0,5 g/ml vzorku proteinu po DEAE-Sepharose, ekvilibrovaný po dobu 12 hodin v TU pufru) byla centrifugována (5000g, 5 minut, 20 °C) a následně smíchána se spojenými frakcemi proteinu po purifikaci na DEAE-Sepharose (kap. 4.2.9.3). Směs byla promíchávána pomalou inverzí po dobu 30 minut při pokojové teplotě a následně centrifugována (6500g, 2 minuty, 20 °C). Supernatant byl odstraněn a k peletu byly přidány 5 $\times$ 2 ml UP pufru. Směs byla po důkladném promíchání následně promíchávána pomalou inverzí dalších 10 minut při pokojové teplotě a poté stočena (6500g, 2 minuty, 20 °C), čímž došlo k eluci navázaného proteinu. Čistota a celistvost proteinu byla analyzována pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20) a stanovení koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích bylo provedeno orientačním testem podle Bradfordové (10  $\mu$ l frakce a 90  $\mu$ l činidla Bradfordové). Pokud byla dalším purifikačním krokem chromatografie na DEAE-Sepharose (kap. 4.2.9.3), byly vybrané frakce spojeny a nanaseny na kolonu naplněnou Sephadexem G-25 (kap. 4.2.9.5) pro převedení do kolonového pufru pro DEAE-Sepharosu (kap. 4.2.9.3).

#### **4.2.9.5 Převedení proteinu do požadovaného pufru gelovou permeační chromatografií na Sephadexu G-25**

Vzorek proteinu (o maximálním objemu 6 ml na každých 15 ml náplně) byl nanesen na kolonu s 15 ml Sephadexu G-25, která byla ekvilibrovaná puftrem, do kterého měl být protein pro další experimenty nebo uchovávání převeden. Protein byl eluován stejným puftrem v 0,5 ml frakcích, které byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20). Celý proces byl prováděn při 4 °C.

#### **4.2.9.6 Purifikace proteinů hydrofobní chromatografií na Phenyl-Sepharose**

Chromatografická kolona byla naplněna 2 ml Phenyl-Sepharosy, promyta deionizovanou vodou a ekvilibrována 8-násobkem objemu náplně kolony pomocí TU

pufri. Frakce proteinu po chromatografii na Sephadexu G-25 (kap. 4.2.9.5) byly spojeny a nanoseny na kolonu s Phenyl-Sepharosou. Kolona s navázaným proteinem byla promyta 8-násobkem kolonového TU pufri a pokud bylo potřeba odstranit LPS, bylo použito odmývání 60% isopropanolem. Protein byl eluován po 1 ml frakcích přidavkem TUE pufri. Množství proteinu bylo měřeno v každé frakci orientačním testem podle Bradfordové (10  $\mu$ l frakce a 90  $\mu$ l Bradfordové činidla). Čistota a celistvost proteinu v jednotlivých frakcích byla analyzována pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20) a konečné stanovení koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích bylo provedeno metodou podle Bradfordové (kap. 4.2.21).

#### **4.2.10 Stanovení lipopolysacharidu**

Do mikrotitrační destičky (Nunc, Dánsko) předehřáté na 37 °C bylo vneseno 50  $\mu$ l vzorku naředěného tak, aby výsledné hodnoty LPS spadaly do lineární oblasti kalibrační křivky (dle instrukcí výrobce). Veškerá ředění byla prováděna v apyrogenní vodě. V čase  $t = 0$  minut bylo přidáno ke vzorku v jamce 50  $\mu$ l lyzátu z ostrorepa (dodávaného v soupravě pro stanovení) a v 10-ti sekundových intervalech nastartovány reakce v případných dalších jamkách přidavkem stejného objemu lyzátu. Doba jedné reakce trvá 10 minut. Po uplynutí této doby bylo do první jamky přidáno 100  $\mu$ l chromogenního substrátu (dodávaného v soupravě pro stanovení) a v 10-ti sekundových intervalech byl substrát přidáván i do jamek ostatních. V čase  $t = 16$  minut od začátku experimentu byla reakce zastavena přidavkem 100  $\mu$ l roztoku 25% kyseliny octové a to opět v 10-ti sekundových intervalech do každé jamky dle původního pořadí. Množství LPS v jednotlivých vzorcích bylo po spektrofotometrické analýze odečteno z přiložené kalibrační křivky.

#### **4.2.11 Kompetiční vazebný experiment – vazba k CHO-CD11b/CD18**

V kompetičním experimentu byla testována schopnost jednotlivých proteinů soutěžit o vazbu k integrinovému receptoru CD11b/CD18 CHO buněk (Chinese Hamster Ovary cell line) s molekulou ACT značenou biotinem. Buňky CHO-CD11b/CD18 byly inkubovány s jednotlivými proteiny v předem zvolených koncentracích po dobu 30 minut na ledu. Poté byl přidán purifikovaný biotinylovaný ACT do výsledné koncentrace 30 nM a intenzita vazby byla stanovena průtokovou

cytometrií po značení navázaného biotinylovaného ACT streptavidin-fykoerytrinem (Pharmingen) v ředění 1:300.

#### **4.2.12 Stanovení prezentace antigenů na MHC molekulách II. třídy**

Jako antigen-prezentující buňky (APC) byly použity slezinné buňky z C57BL/6 myši, které byly inkubovány s různými koncentracemi proteinu MalE-RTX, jeho delečních variant a příslušných kontrolních proteinů. Tyto APC byly kokultivovány s anti-MalE CD4<sup>+</sup> T-buněčnými hybridomy (CRM3, 10<sup>5</sup> buněk), které jsou schopny specificky rozpoznávat komplexy molekul MHC II. třídy s navázaným MalE peptidem na povrchu APC, a jejichž stimulace může být monitorována pomocí interleukinu 2 (IL-2) uvolňovaného do supernatantu. Po 18 hodinách kultivace byly supernatanty z této kultury zamrazeny po dobu 2 hodin při teplotě -80 °C a poté inkubovány (100 µl) s cytotoxickými T-lymfocyty (CTLL, 10<sup>4</sup> buněk), jejichž proliferace je stimulována v přítomnosti IL-2. Po 24 hodinách byl do jamky přidán radioaktivní [<sup>3</sup>H]thymidin v koncentraci 50 µCi na jamku. Po 6 hodinách byly buňky sklizeny a byla stanovena koncentrace inkorporovaného [<sup>3</sup>H]thymidinu.

#### **4.2.13 Produkce a purifikace proteinů použitých při studiu purifikačního systému založeného na SPM proteinu FrpC**

##### **4.2.13.1 Kultivace buněk v 500 ml kulturách**

Buňky *E. coli* BL21(λDE3) byly transformovány (kap. 4.2.4) příslušným plasmidem a vyočkovány na plotnu s tuhým LB agarem obsahujícím příslušné antibiotikum. Po noční inkubaci byla z plotny zaočkována do 2 ml tekutého LB média s příslušným antibiotikem jedna bakteriální kolonie. Za intenzivního třepání byla bakteriální kultura pěstována po 10 až 16 hodin při 37 °C nebo při 30 °C. Poté bylo z takto připravené kultury odebráno 0,5 ml do 50 ml MDO média předehřátého na příslušnou teplotu a obsahujícího příslušné antibiotikum. Kultura byla za intenzivního třepání kultivována 10 hodin. Následně bylo odebráno 5 ml pro zaočkování 500 ml čerstvého MDO média s příslušným antibiotikem. Kultura se nechala rozrůst do OD<sub>600</sub> = 1,0 pro ACT a OD<sub>600</sub> = 0,6 pro ostatní proteiny a ihned poté byla provedena indukce syntézy proteinu roztokem IPTG o výsledné koncentraci 1 mM. Kultivace pokračovala

další 3-4 hodiny, poté byla kultura rychle ochlazená v ledu a dále zpracovávána (kap. 4.2.13.2).

#### **4.2.13.2 Příprava cytosolického extraktu**

Buňky *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) po expresi příslušného proteinu (kap. 4.2.13.1) byly od kultivačního MDO média odděleny centrifugací (6000g, 20 minut, 4 °C) a dvakrát promyty ve 20 ml TNE pufru (6000g, 20 minut, 4 °C). Po resuspendování peletu v dalších 20 ml TNE pufru byly buňky rozrušeny sonikací (4×30 sekund, 60 W, 4 °C), extrakt centrifugován (20000g, 20 minut, 4 °C) a supernatant obsahující příslušný protein ihned dále zpracováván, nebo v případě nutnosti zamražen na -20 °C.

#### **4.2.13.3 Purifikace proteinů afinitní chromatografií na Ni-NTA agarose**

Cytosolický extrakt (kap. 4.2.13.2) byl nanesen na 7 ml Ni-NTA agarosy ekvilibrované 8-násobkem objemu náplně kolony TN pufrům. Nenavázané proteiny byly odmyty 8-násobným množstvím objemu náplně kolony přidávkem stejného pufru. Zachycený protein byl eluován po 1 ml frakcích 250 mM imidazolem v TN pufru. Takto získané frakce byly převedeny na Sephadex G-25 (kap. 4.2.13.8) pro odstranění přítomného imidazolu. Pokud byl rekombinantní protein fúzovaný k samoštěpitelné afinitní kotvě SPM-C-His štěpen na koloně, bylo po odmytí nenavázaných proteinů štěpení fúzního proteinu indukováno přidávkem 15 ml TN pufru obsahujícího 10 mM  $\text{CaCl}_2$  a 10 mM DTT. Po protečení prvních 10 ml byla kolona uzavřena a ponechána při pokojové teplotě, případně při 4 °C po dobu 6, resp. 16 hodin. Poté byl jímán odštěpený rekombinantní protein vytékající z kolony a jeho eluce byla dokončena přidávkem TN pufru. Eluovaný protein byl následně zbaven vápenatých iontů a DTT a převeden do TNE pufru pomocí gelové permeační chromatografie na Sephadexu G-25 (kap. 4.2.13.8). Množství a čistota proteinu v průběhu všech purifikačních kroků byly kontrolovány pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20) a koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích byla stanovena metodou podle Bradfordové (kap. 4.2.21).

#### **4.2.13.4 Purifikace proteinů afinitní chromatografií na chitinu pomocí systému založeného na inteinu**

Na chromatografickou kolonu s 10 ml chitinových partikulí ekvilibrovaných TNE puforem byl nanesen cytosolický extrakt (kap. 4.2.13.2) obsahující protein určený k purifikaci. Kolona byla promyta 8-násobkem objemu partikulí TNE puforem. Indukce štěpení fúzního proteinu byla provedena 15 ml TNE pufru obsahujícího 50 mM DTT. Po protečení prvních 10 ml byla kolona uzavřena a ponechána 16 hodin při 4 °C. Poté byl jímán odštěpený protein vytékající z kolony a jeho eluce byla dokončena přidavkem TNE pufru. Vzorek proteinu byl následně zbaven DTT a převeden do TNE pufru pomocí gelové permeační chromatografie na Sephadexu G-25 (kap. 4.2.13.8).

#### **4.2.13.5 Purifikace proteinů afinitní chromatografií na chitinu pomocí systému založeného na SPM proteinu FrpC**

Na chromatografickou kolonu s 10 ml chitinových partikulí ekvilibrovaných TNE puforem byl nanesen cytosolický extrakt (kap. 4.2.13.2) obsahující příslušný fúzní protein. Kolona byla promyta 8-násobkem objemu náplně TNE puforem a následně ještě 20 ml TN pufru. Indukce štěpení fúzního proteinu byla provedena 15 ml TN pufru obsahujícího 10 mM CaCl<sub>2</sub> a 10 mM DTT. Po protečení prvních 10 ml byla kolona uzavřena a ponechána při pokojové teplotě, případně při 4 °C po dobu 6, resp. 16 hodin. Poté byl jímán odštěpený rekombinantní protein vytékající z kolony a jeho eluce byla dokončena přidavkem TN pufru. Eluovaný protein byl následně zbaven vápenatých iontů a DTT a převeden do TNE pufru pomocí gelové permeační chromatografie na Sephadexu G-25 (kap. 4.2.13.8).

#### **4.2.13.6 Purifikace proteinů afinitní chromatografií na amylose**

Připravený cytosolický extrakt (kap. 4.2.13.2) byl nanesen na 7 ml náplně amylosy, předem promyté několika objemy deionizované vody a ekvilibrované kolonovým TNE puforem. Kontaminující proteiny byly odmyty přidavkem 8-násobku objemu náplně kolonovým puforem a navázaný protein byl eluován po 1 ml frakcích pomocí 10 mM maltosy v TN pufru. Protein po eluci byl pro odstranění maltosy a převedení do pufru pro další experimenty nanesen na Sephadex G-25 (kap. 4.2.13.8). Stanovení koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích bylo provedeno metodou podle

Bradfordové (kap. 4.2.21) a čistota proteinu byla analyzována pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20).

#### **4.2.13.7 Purifikace proteinů afinitní chromatografií na glutathion agarose**

Kolona byla naplněna 5 ml glutathion (GSH) agarosy, důkladně promyta deionizovanou vodou a ekvilibrována 8-násobkem objemu náplně kolonovým pufrům obsahujícím PBS a 1 mM EDTA. Na takto připravenou kolonu byl nanesen cytosolický extrakt příslušného proteinu (kap. 4.2.13.2). Kontaminující proteiny byly odmyty 8-násobkem objemu náplně kolonovým pufrům a protein byl poté eluován po 1 ml frakcích PBS pufrům s 5 mM glutathionem. Stanovení koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích bylo provedeno metodou podle Bradfordové (kap. 4.2.21) a čistota proteinu byla analyzována pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20).

#### **4.2.13.8 Převedení proteinu do požadovaného pufru gelovou permeační chromatografií na Sephadexu G-25**

Vzorek proteinu (o maximálním objemu 6 ml na každých 15 ml náplně) byl nanesen na kolonu s 15 ml Sephadexu G-25, která byla ekvilibrována pufrům, do kterého měl být protein pro další experimenty převeden. Protein byl eluován stejným pufrům v 0,5 ml frakcích, které byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20).

#### **4.2.14 Analýza GST a SPM-C-His pomocí hmotnostní spektrometrie**

Proteinové proužky odpovídající velikostí GST a SPM-C-His byly po dělení vzorku pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20) vyříznuty z gelu, odbarveny a štěpeny přidavkem trypsinu. Získaná směs peptidů byla po extrakci dělena HPLC na reverzní fázi a sbírané frakce byly následně analyzovány hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF. Získané hodnoty  $m/z$  v hmotnostních spektrech byly porovnány s teoretickou proteolytickou mapou peptidů z proteinu GST a FrpC. Celá tato část práce byla provedena v Laboratoři určování molekulové struktury (MBÚ AV ČR, Praha) RNDr. M. Šulcem, Ph.D.



#### 4.2.15 Charakterizace SPM-zprostředkovaného štěpení fúzních proteinů

Fúzní proteiny purifikované afinitní chromatografií na chitinu (kap. 4.2.13.4), amylose (kap. 4.2.13.6) nebo GSH agarose (kap. 4.2.13.7) a převedené do TNE pufru na Sephadexu G-25 (kap. 4.2.13.8) byly štěpeny v roztoku. Do sady mikrozkušavek obsahujících 25  $\mu$ l DTT bylo vždy odebráno 200  $\mu$ l fúzního proteinu a přidáno 25  $\mu$ l roztoku vápenatých iontů v TN pufru do výsledné koncentrace 2, 5, 10 nebo 50 mM. Ihned byl odebrán z každé zkumavky první vzorek a tento použit pro měření původního množství neštěpeného proteinu v daném vzorku. Jedna sada zkumavek obsahujících postupně všechny čtyři koncentrace vápenatých iontů byla ponechána při pokojové teplotě, zatímco druhá byla inkubována ve 4 °C. Vzorky byly inkubovány po dobu 6 hodin (při pokojové teplotě), resp. 16 hodin (ve 4 °C) a v průběhu této doby byly odebírány 20  $\mu$ l alikvoty. Po každém odběru byla reakce zastavena přidávkem vzorkového pufru pro SDS-PAGE s 50 mM EDTA. Produkty štěpení byly analyzovány SDS-PAGE v 7,5%, či 10% polyakrylamidovém gelu (kap. 4.2.20).

#### 4.2.16 Densitometrická analýza SDS-PAGE gelů

7,5% polyakrylamidové gely s rozdělenými produkty štěpení (kap. 4.2.20) byly po barvení Coomassie Blue a odbarvení převedeny do digitální formy pomocí scanneru a programu PDQuest (PDI, USA) (s nastavenou velikostí pixelu 42  $\mu$ m x 42  $\mu$ m a rozsahem OD 0-1,5). Vyhodnocení jednotlivých proteinových proužků bylo provedeno programem AIDA 2.11, 2D Densitometry (Raytest, SRN). Při výpočtu byly porovnávány integrované intenzity signálu proužku odpovídajícího celistvé formě fúzního proteinu štěpeného vzorku a negativní kontroly (neštěpeného vzorku), která byla součástí každého polyakrylamidového gelu (relativní srovnání). Výpočet byl proveden podle vzorce:

$$\text{Indukované štěpení fúzního proteinu} = \frac{S_N - S_S}{S_N} \cdot 100 \quad [\%]$$

S<sub>N</sub>..... integrovaná intenzita signálu proužku odpovídajícího celistvé formě fúzního proteinu negativní kontroly snižená o integrovanou intenzitu signálu pozadí gelu

S<sub>š</sub>..... integrovaná intenzita signálu proužku odpovídajícího celistvé formě fúzního proteinu štěpeného vzorku snižená o integrovanou intenzitu signálu pozadí gelu

Každý vzorek byl měřen ve čtyřech různých stanoveních, z nichž byla vypočtena průměrná hodnota Ca<sup>2+</sup>-indukovaného štěpení fúzního proteinu a směrodatná odchylka a získané výsledky byly vyneseny do grafu (Excel, Microsoft, USA).

#### **4.2.17 Stanovení enzymatické aktivity chloramfenikol acetyltransferasy**

Z purifikovaného N-His CAT proteinu (kap. 4.2.13.3, 4.2.13.5) bylo odebráno 10 µl, které byly naředěny přidavkem 940 µl RM pufru předehřátých na 37 °C. Ředění vzorku by mělo být takové, aby v průběhu reakce nedocházelo ke zvýšení naměřených hodnot absorbance o více než 0,05-0,1/min. Takto připravený vzorek byl inkubován při teplotě 37 °C po dobu 1 minuty, stejně tak jako slepý vzorek stejného složení. Po uplynutí jedné minuty byla ve vzorku změřena absorbance při 412 nm, tato hodnota odpovídá hodnotě ΔE<sub>nespec</sub>. Ke vzorku bylo přidáno 50 µl 5 mM roztoku chloramfenikolu, směs byla důkladně promíchána a inkubována při 37 °C po dobu 3 minut. V předem zvolených časových intervalech byla v reakční směsi měřena absorbance při 412 nm oproti slepému vzorku, do nějž nebyl přidán chloramfenikol. Naměřené hodnoty odpovídají hodnotám ΔE<sub>spec</sub>. Specifická aktivita chloramfenikol acetyltransferasy byla vypočtena podle následujícího vztahu:

$$A [\mu\text{mol/ml/min}] = (\Delta E / t [\text{min}] \times V_{\text{celk.}}[\text{ml}]) / (\varepsilon \times V_{\text{extrakt}}[\text{ml}]), \quad \Delta E = \Delta E_{\text{spec}} - \Delta E_{\text{nespec}}$$
$$\varepsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1}$$

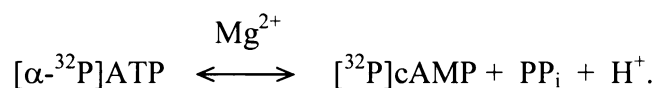
#### 4.2.18 Stanovení enzymatické aktivity $\beta$ -galaktosidasy

Do mikrozkuřavky bylo odebráno 10  $\mu$ l purifikovaného proteinu LacZ (kap. 4.2.13.3, 4.2.13.5) a přidáno 940  $\mu$ l pufru Z předeřřátého na 28 °C. Reakce byla nastartována přidavkem 0,2 ml substrátu (o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galaktosid) o koncentraci 4 mg/ml. Reakční směs byla inkubována při 28 °C až do vyvinutí světle žlutého zbarvení, kdy byla reakce zastavena přidavkem 0,5 ml 1 M uhličitanu sodného. Byl odečten čas trvání reakce a následně byla změřena hodnota absorbance při 420 nm. Specifická aktivita  $\beta$ -galaktosidasy byla vypočtena z následujícího vztahu:

$$A \text{ [Millerovy jednotky]} = A_{420} / (t[\text{min}] \times V[\text{ml}] \times c[\text{g/ml}])$$

#### 4.2.19 Stanovení katalytické aktivity AC domény ACT

Enzymaticky aktivní AC doména adenylát cyklasového toxinu bakterie *B. pertussis*, katalysuje po vstupu do cílových buněk hostitele přeměnu molekuly ATP na cAMP. Stejným způsobem je schopna katalyzovat přeměnu radioaktivního ATP na cAMP *in vitro* podle následující reakce:



Jak je zřejmé z uvedené rovnice bylo při stanovení použito radioaktivně značeného substrátu  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , který je v průběhu reakce přeměňován na radioaktivní  $[^{32}\text{P}]\text{cAMP}$ . Ten byl po proběhnutí reakce oddělen z reakční směsi pomocí adsorpční chromatografie na oxidu hlinitém při pH 7,6, přičemž se cAMP na rozdíl od negativně nabitých látek (ATP, ADP, AMP a  $\text{PP}_i$ ) neadsorbuje na kolonu, ale volně prochází. Po změření radioaktivity ve všech vzorcích bylo vypočteno množství vzniklého cAMP (118).

5  $\mu$ l vzorku proteinu bylo přidáno k 50  $\mu$ l reakční směsi v mikrozkuřavce, obsah byl promíchán a umístěn do 30 °C. V časových intervalech 30 sekund byly postupně spuštěny reakce v ostatních vzorcích. Zároveň byl připraven slepý vzorek, který obsahoval pouze reakční směs bez přítomnosti katalyticky aktivní AC domény a také pozitivní kontrolní vzorek, který obsahoval w.t. ACT. Reakce probíhala 5 minut při teplotě 30 °C, byla zastavena přidáním 200  $\mu$ l 0,5 M HCl a vzorky byly vloženy na 5

minut do termostátovaného suchého bloku s teplotou 100 °C. Následně bylo upraveno pH na hodnotu 7,6 přidávkem 0,2 ml 1,5 M imidazolu. Směs byla nanášena na chromatografické kolony (Poly-Prep, Bio-Rad, USA) naplněné neutrálním oxidem hlinitým a cAMP bylo eluováno 10 mM roztokem imidazolu o pH 7,6. K eluátu bylo přidáno 10 ml scintilačního roztoku a obsah byl důkladně protřepán. V takto připravených vzorcích byla po dobu 1 minuty měřena radioaktivita pro [<sup>32</sup>P] i [<sup>3</sup>H] (vnitřní standard). Radioaktivita byla změřena také v původní reakční směsi.

Naměřené hodnoty pro jednotlivé vzorky byly upraveny vzhledem ke ztrátám vzniklým vazbou k matici pomocí hodnot radioaktivity vnitřního standardu ([<sup>3</sup>H]cAMP). Dále byly od každé hodnoty odečteny hodnoty dosažené pro slepý vzorek a ze známého množství [<sup>32</sup>P]ATP, jeho hodnoty radioaktivity a ze změřené radioaktivity [<sup>32</sup>P]cAMP bylo vypočítáno množství vzniklého cAMP. Při výpočtu se postupovalo podle vztahu:

$$A = \frac{n \cdot (A_{PV} - A_{PB}) \cdot d \cdot A_{HR}}{A_{PR} \cdot V_{ME} \cdot t \cdot A_{HV}}$$

A. . . . . adenylát cykloasová aktivita vzorku [μmol/min/ml extraktu]

A<sub>PV</sub>. . . . radioaktivita <sup>32</sup>P ve vzorku [DPM]

A<sub>PB</sub>. . . . radioaktivita <sup>32</sup>P v slepém vzorku [DPM]

A<sub>PR</sub>. . . . radioaktivita <sup>32</sup>P v 50 μl reakční směsi [DPM]

A<sub>HV</sub>. . . . radioaktivita [2,8-<sup>3</sup>H]cAMP ve vzorku [DPM]

A<sub>HR</sub>. . . . radioaktivita [2,8-<sup>3</sup>H]cAMP v 50 μl reakční směsi [DPM]

n. . . . . látkové množství ATP v 50 μl reakční směsi [μmol]

d. . . . . ředění močovinového extraktu

V<sub>ME</sub>. . . . . objem přidaného ředěného močovinového extraktu k 50 μl reakční směsi [ml]

t. . . . . reakční čas [min]

#### 4.2.20 Elektroforesa v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

K 20 μl vzorku proteinu bylo přidáno 5 μl vzorkového pufru určeného pro elektroforesu 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%, resp. 10% roztředovacího gelu. Po proběhnutí elektroforesy ( $8 \text{ V/cm}^2$  pro zaostřovací gel a  $15 \text{ V/cm}^2$  pro roztředovací gel) v Tris-glycinovém pufru (pH 8,3) byly rozdělené proteiny v gelu barveny barvicím roztokem po dobu 2 hodin. Poté byly tyto gely odbarveny odbarvovacím roztokem a přeneseny do uchovávacího roztoku, případně vysušeny. Pro porovnání molekulové hmotnosti rozdělených proteinů byl použit standard molekulových hmotností.

#### **4.2.21 Stanovení koncentrace proteinů**

Ke stanovení koncentrace proteinů ve vzorku bylo použito metody podle Bradfordové (119). Nejdříve byla v rozmezí 10-100  $\mu\text{g/ml}$  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  $\mu\text{l}$  jednotlivých ředěných standardů, 100  $\mu\text{l}$  vzorku a 100  $\mu\text{l}$  samotného pufru (referenční standard) přidáno 900  $\mu\text{l}$  činidla Bradfordové. Vzorky byly promíchány a inkubovány při pokojové teplotě 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.

## 5 Výsledková část

### 5.1 Výsledky studia proteinu ACT

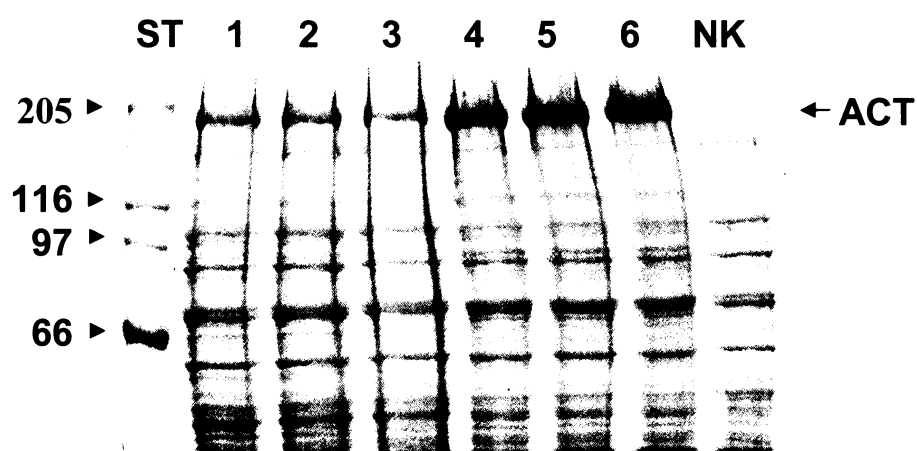
#### 5.1.1 Zavedení nového systému pro expresi rekombinantního ACT a jeho derivátů a jeho porovnání se systémem stávajícím

Pro produkci rekombinantního proteinu ACT a jeho derivátů je v současné době využíváno plasmidu pT7CACT1 (kap. 4.1.8), ve kterém je před genem pro acyltransferasu *CyaC*, posttranslačně modifikující ACT protoxin zbytky mastné kyseliny (kap. 2.1.3), ribosom-vazebné místo genu 10 bakteriofága T7 (RBS<sub>10</sub>). Před genem *cyaA*, kódujícím vlastní ACT protoxin, je pak slabší ribosom-vazebné místo genu pro  $\beta$ -galaktosidasu (RBS <sub>$\beta$ -gal</sub>). Tento plasmid je běžně transformován do buněk *E. coli* XL1-Blue, které nesou gen pro tetracyklinovou rezistenci.

Za účelem zvýšení produkce rekombinantního ACT a jeho derivátů byl navržen a otestován nový systém založený na expresi genu pro ACT z plasmidu pT7CT7ACT1 (kap. 4.1.8) v buňkách *E. coli* BL21 nesoucích plasmid pMM100 (kap. 4.1.8). Tento systém skýtá řadu výhod: (i) plasmid pT7CT7ACT1 obsahuje jak před genem *cyaC*, tak před genem *cyaA* silnější RBS<sub>10</sub> oproti slabšímu RBS <sub>$\beta$ -gal</sub> před genem *cyaA* v pT7CACT1, což má za následek vyšší hladinu exprese proteinu, (ii) kmen *E. coli* BL21 neprodukuje ani Lon ani OmpT proteasu, nedochází tedy k degradaci produkovaného rekombinantního proteinu, (iii) kmen *E. coli* BL21 je ve srovnání s kmenem XL1-Blue robustnější, buňky rostou rychleji a jsou schopny dorůst do vyšších optických densit, (iv) kmen *E. coli* BL21 nenesou na rozdíl od kmene XL1-Blue gen pro žádný typ rezistence, je zde tedy možná propagace plasmidu pMM100, který nese tetracyklinovou rezistenci, (v) plasmid pMM100 nese gen pro LacI<sup>q</sup> represor, jenž snižuje bazální hladinu exprese genů z příslušného lac promotoru (předcházejícího jak genu *cyaC*, tak *cyaA*) před indukcí jejich exprese pomocí IPTG. To vede ke snížení toxicity výsledných proteinových produktů pro buňky *E. coli* a tím k rychlejšímu a většímu nárůstu produkující biomasy před indukcí.

Nejdříve byla srovnávána účinnost exprese rekombinantního ACT z plasmidů pT7CACT1 a pT7CT7ACT1 v buňkách *E. coli* BL21/pMM100. V prvním kroku byly připraveny kompetentní buňky *E. coli* BL21/pMM100 (kap. 4.2.2), do kterých byly

transformovány odděleně oba plasmidy (kap. 4.2.4). Poté byly z transformovaných buněk připraveny kultury pro expresi ACT (kap. 4.2.7), přičemž jak v případě buněk BL21/pMM100/pT7CACT1, tak buněk BL21/pMM100/pT7CT7ACT1 byly kultivovány tři nezávislé kultury. Všechny byly indukovány přidavkem 1 mM IPTG při optické densitě  $OD_{600} = 1,0$  a kultivovány další čtyři hodiny. Nakonec byly kultury upraveny na stejnou optickou densitu, aby měly dosažené hladiny produkovaného ACT v rámci jednotlivých experimentů stejnou vypovídající hodnotu a z kultur byly připraveny lyzáty (kap. 4.2.7), které byly analyzovány pomocí 7,5% SDS-PAGE (kap. 4.2.20) (Obr. 15).

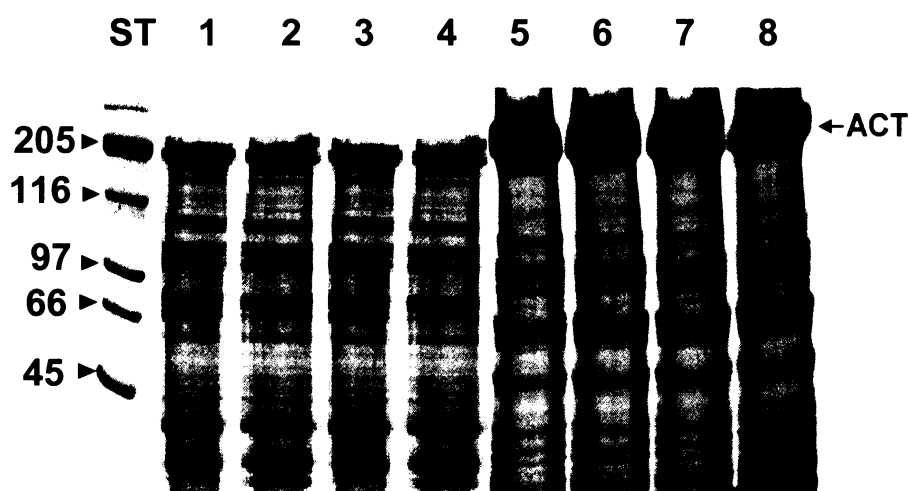


Obr. 15: Lyzáty buněk BL21/pMM100/pT7CACT1 a BL21/pMM100/pT7CT7ACT1 po expresi ACT dělené pomocí 7,5% SDS-PAGE. (1-3) exprese ACT ze tří nezávislých klonů BL21/pMM100/pT7CACT1; (4-6) exprese ACT ze tří nezávislých klonů BL21/pMM100/pT7CT7ACT1; (NK) neindukovaná kultura BL21/pMM100; (ST) standard molekulových hmotností (kDa).

Dále byla srovnávána účinnost exprese toxinu z plasmidu pT7CT7ACT1 v buňkách *E. coli* XL1-Blue a *E. coli* BL21/pMM100. Plasmid pT7CT7ACT1 byl nejdříve transformován jak do buněk XL1-Blue, tak do buněk BL21/pMM100 (kap. 4.2.4). V případě buněk XL1-Blue/pT7CT7ACT1 i buněk BL21/pMM100/pT7CT7ACT1 byly vzaty k následné kultivaci a expresi ACT čtyři nezávislé kultury. Ty byly indukovány přidavkem 1 mM IPTG při  $OD_{600} = 1,0$  a poté kultivovány další čtyři hodiny. Po této době byly kultury upraveny na stejnou optickou

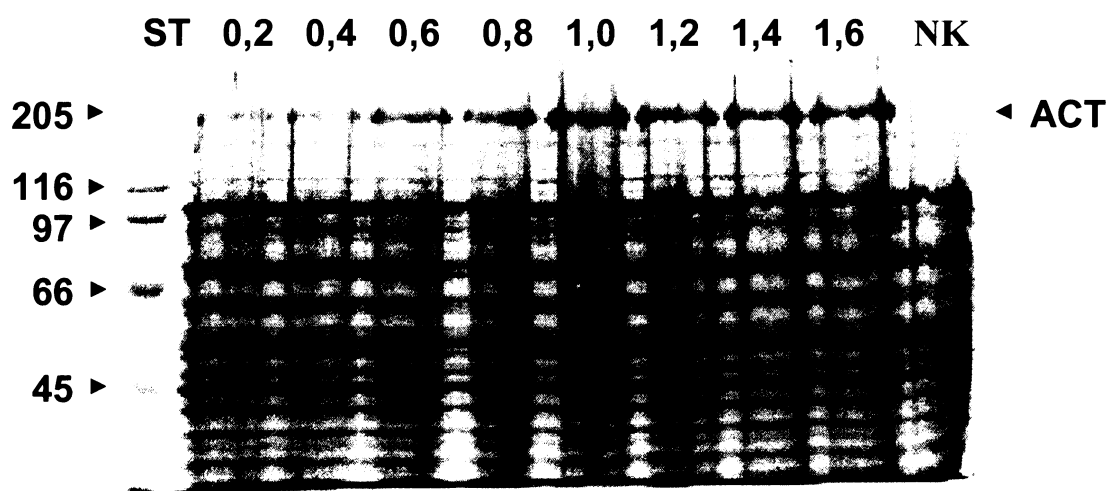
densitu a použity pro přípravu lyzátů (kap. 4.2.7), které byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20) (Obr. 16).

Nakonec byla hledána nejvhodnější optická densita buněk BL21/pMM100/pT7CT7ACT1 pro jejich indukci k expresi co nejvyšších hladin ACT. K tomu byla kultivována 50 ml kultura buněk BL21/pMM100/pT7CT7ACT1, z níž byly po dosažení optických densit 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4 a 1,6 odebrány 2 ml alikvoty buněk, které byly indukovány pomocí 1 mM IPTG a pěstovány další čtyři hodiny. Nakonec byly všechny kultury upraveny na stejnou optickou densitu a byly z nich připraveny lyzáty (kap. 4.2.7), které byly děleny pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20) (Obr. 17).



Obr. 16: Lyzáty buněk XL1-Blue/pT7CT7ACT1 a BL21/pMM100/pT7CT7ACT1 exprimující ACT a dělené pomocí 7,5% SDS-PAGE. (1-4) exprese ACT ze čtyř nezávislých klonů XL1-Blue/pT7CT7ACT1; (5-8) exprese ACT ze čtyř nezávislých klonů BL21/pMM100/pT7CT7ACT1; (ST) standard molekulových hmotností (kDa).





Obr. 17: Lyzáty buněk BL21/pMM100/pT7CT7ACT1 po indukci exprese ACT při různých optických densitách a dělení pomocí 7,5% SDS-PAGE. Kultury BL21/pMM100/pT7CT7ACT1 byly indukovány při optických densitách, jejichž hodnoty jsou uvedeny v horní části gelu; (NK) neindukovaná kultura BL21/pMM100; (ST) standard molekulových hmotností (kDa).

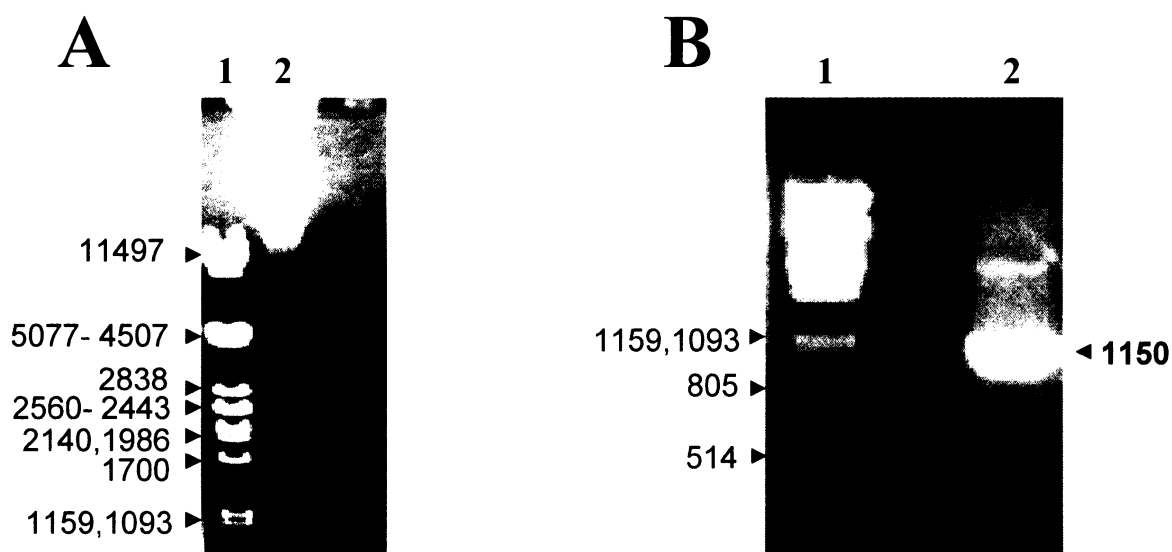
Z dosažených výsledků je zřejmé, že hladiny produkovaného ACT v nově zavedeném systému založeném na plasmidu pT7CT7ACT1 a buňkách *E. coli* BL21/pMM100 jsou přibližně třikrát vyšší než v systému původním (odhad založen na základě densitometrické analýzy získaných gelů, kap. 4.2.16), zahrnujícím použití plasmidu pT7CACT1 a buněk *E. coli* XL1-Blue. Navíc, optické density kultur buněk BL21/pMM100/pT7CT7ACT1 v intervalu mezi 1,0 až 1,6 se ukázaly jako nejvhodnější pro indukci exprese co nejvyšších množství ACT v poměru k celkovému buněčnému proteinu. V dalších experimentech proto bude využíván systém založený na plasmidu pT7CT7ACT1 a buňkách BL21/pMM100 a zcela nahradí systém stávající, založený na plasmidu pT7CACT1 a buňkách *E. coli* XL1-Blue.

## 5.1.2 Příprava plasmidů pro expresi fúzního proteinu MalE-RTX a jeho delečních variant

Jak již bylo podrobně zmíněno výše (kap. 2.1.5), ACT je využíván pro dopravu různých typů cizorodých epitopů do APC. Následující část práce měla za cíl připravit konstrukty založené na bázi ACT, pomocí nichž by bylo možné zjistit: (i) zda RTX hemolysinová část ACT je schopna dopravovat do APC celé proteiny, a ne pouze jejich jednotlivé epitopy, a umožnit tak jejich následnou prezentaci na MHC molekulách II. třídy. K tomuto účelu byl použit celý protein MalE (42 kDa) z *E. coli* K12, který v molekule ACT nahradil AC doménu a vznikl tak fúzní protein MalE-RTX (zkratka RTX v tomto případě označuje celou RTX hemolysinovou část proteinu ACT a bude pro zkrácení používána v celém následujícím textu, stejně tak i *rtx* v případě genu). MalE protein nebyl zvolen náhodně, ale protože nese CD4<sup>+</sup> T-buněčný epitop (NGKLIAYPIAVEALS), který byl již dříve pomocí ACT účinně dopravován do APC a prezentován molekulami MHC II. třídy (85); (ii) zda je k dopravě fúze MalE-RTX do APC a následně k prezentaci na MHC glykoproteinech II. třídy nezbytná hydrofobní doména toxinu nebo její část.

### 5.1.2.1 Izolace genu kódujícího protein MalE z buněk *E. coli* K12

Gen pro protein MalE byl získán jeho PCR amplifikací (kap. 4.2.6.5) z izolované chromosomální DNA *E. coli* K12 (kap. 4.2.2) (Obr. 18) za použití dvojice primerů MalE\_For a MalE\_Back (kap. 4.1.6). Výsledný PCR produkt o velikosti 1150 pb je ohraničen zásahovými místy pro restriční endonukleasu Nde I, resp. BstB I, která jsou určena pro klonování PCR fragmentu do připraveného plasmidu pT7CT7ACT1 (kap. 4.1.8). Přítomnost PCR produktu o velikosti 1150 pb v reakční směsi byla ověřena pomocí elektroforesy v agarosovém gelu (kap. 4.2.6.6) (Obr. 18).



Obr. 18: **Elektroforesa DNA fragmentů v 1% agarosovém gelu v přítomnosti ethidium bromidu. A) Chromosomální DNA extrahovaná z *E. coli* K12.** (1) velikostní standard ( $\lambda$ -DNA štěpená restriční endonukleasou Pst I); (2) izolovaná chromosomální DNA. **B) Gen *malE* získaný PCR amplifikací.** (1) velikostní standard ( $\lambda$ -DNA štěpená restriční endonukleasou Pst I); (2) PCR fragment nesoucí gen *malE*. Velikosti jednotlivých DNA fragmentů jsou uvedeny v počtu párů basí.

### 5.1.2.2 Konstrukce plasmidů nesoucích gen pro protein MalE fúzovaný s genem pro RTX hemolysin ACT nebo s delečními variantami RTX hemolysinu

Ke konstrukci plasmidu pT7CT7-*malE*-*rtx*- $\Delta$ *cyaC*, z něhož bude exprimován neacylovaný fúzní protein MalE-RTX, byl použit plasmid pT7CT7ACT1 (kap. 4.1.8). Ten byl štěpen restričními endonukleasami Nde I, BstB I (kap. 4.2.6.1), defosforylován (kap. 4.2.6.2) a vzniklé fragmenty byly děleny elektroforesou v agarosovém gelu (kap. 4.2.6.6). Fragment o velikosti 6947 pb byl izolován (kap. 4.2.6.7) a ligován (kap. 4.2.6.4) s fragmentem o velikosti 1118 pb, který vznikl po štěpení PCR fragmentu nesoucího gen *malE* (kap. 5.1.2.1) restričními endonukleasami Nde I, BstB I (kap. 4.2.6.1) a byl taktéž izolován z agarosového gelu (kap. 4.2.6.7). Vzhledem k tomu, že plasmid pT7CT7ACT1 nese dvě zásahová místa pro enzym Nde I, byl z fragmentu o velikosti 6947 pb použitého k ligaci odstraněn gen pro protein CyaC, katalyzující acylaci RTX hemolysinu. Ligační směs byla transformována do

kompetentních buněk *E. coli* XL1-Blue (kap. 4.2.4) a z jednotlivých kolonií byla izolována plasmidová DNA (kap. 4.2.5.1). Správné plasmidy nesoucí fúzi *malE-rtx* byly nalezeny pomocí restrikční analýzy a označeny jako pT7CT7-*malE-rtx-ΔcyaC*. Tyto plasmidy byly transformovány do buněk BL21/pMM100 (kap. 4.2.4), v nichž byla po kultivaci, indukci a přípravě buněčných lyzátů (kap. 4.2.7) ověřena exprese neacylovaného proteinu MalE-RTX pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20). K dalšímu klonování a dalším kultivacím pak byl vybrán jeden plasmid pT7CT7-*malE-rtx-ΔcyaC*, z něhož byl úspěšně exprimován fúzní protein. U tohoto plasmidu bylo sekvenací (kap. 4.2.8) ověřeno, že gen *malE* získaný PCR amplifikací nenesl žádné nežádoucí mutace.

Při konstrukci plasmidu pT7CT7-*malE-rtx*, z něhož bude exprimován acylovaný fúzní protein MalE-RTX, se vycházelo z plasmidu pT7CT7-*malE-rtx-ΔcyaC*, který byl linearizován enzymem Nde I (kap. 4.2.6.1), defosforylován (kap. 4.2.6.2) a ligován (kap. 4.2.6.4) s Nde I-Nde I fragmentem (831 pb) izolovaným z agarosového gelu (kap. 4.2.6.7) po štěpení plasmidu pT7CT7ACT1 stejným enzymem (kap. 4.2.6.1). Ligační směs byla transformována do buněk *E. coli* XL1-Blue (kap. 4.2.4) a z kolonií byla izolována plasmidová DNA (kap. 4.2.5.1). Přítomnost fragmentu nesoucího gen *cyaC* a jeho orientace byla v plasmidech ověřena restrikční analýzou a správné plasmidy byly označeny jako pT7CT7-*malE-rtx*. Ty byly nakonec transformovány do buněk BL21/pMM100 (kap. 4.2.4), v nichž byla po kultivaci, indukci a přípravě buněčných lyzátů (kap. 4.2.7) ověřena exprese fúzního proteinu MalE-RTX pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20). K dalším kultivacím pak byl vybrán jeden plasmid pT7CT7-*malE-rtx*, z něhož byl úspěšně exprimován MalE-RTX.

K expresi kontrolního detoxifikovaného ACT (ACT/E5), který není schopen katalyzovat přeměnu ATP na cAMP, byl zkonstruován plasmid pT7CT7ACT1/E5. K tomu byl nejdříve pomocí parciálního štěpení restrikční endonukleasou EcoR V (kap. 4.2.6.1) linearizován plasmid pT7CT7ACT1 (kap. 4.1.8), který byl po izolaci z agarosového gelu (kap. 4.2.6.7) ligován (kap. 4.2.6.4) se syntetickým oligonukleotidovým adaptérem nesoucím zásahové místo pro enzym BamH I (5'-GGATCC-3') a kódujícím dipeptid GlySer. Ligační směs byla transformována do *E. coli* XL1-Blue (kap. 4.2.4) a z izolovaných kolonií byla připravena plasmidová DNA (kap. 4.2.5.1). Vložení oligonukleotidu do plasmidu bylo ověřeno restrikční analýzou a správné plasmidy, pT7CT7ACT1/E5, byly transformovány do buněk BL21/pMM100

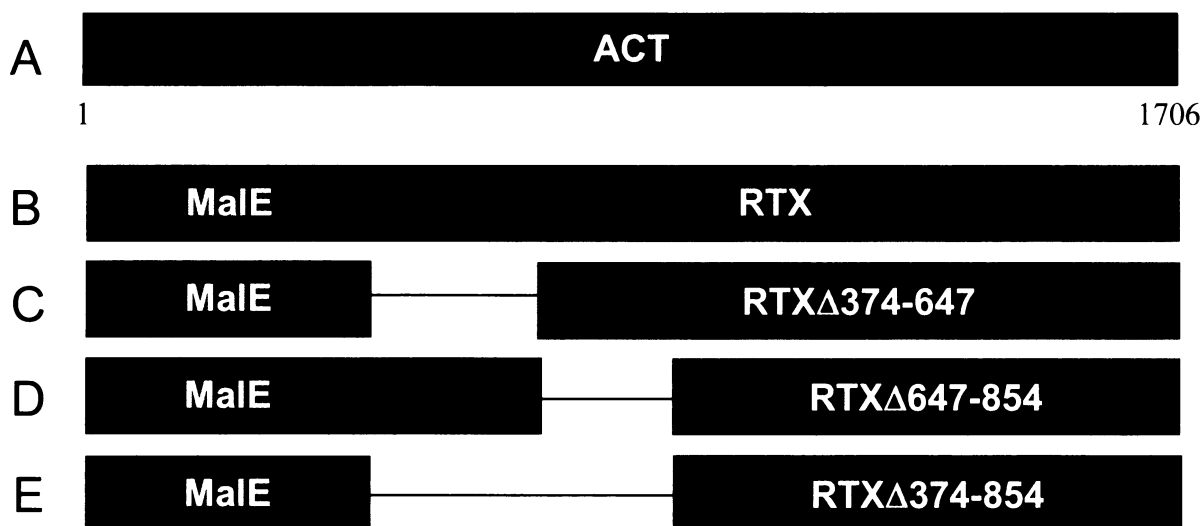
(kap. 4.2.4). Z nich byly po kultivaci a indukci připraveny buněčné lyzáty (kap. 4.2.7), v nichž byla exprese ACT/E5 ověřena pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20).

Při přípravě plasmidu pT7CT7-*malE-rtx*Δ374-854 se vycházelo z pT7CT7-*malE-rtx*, který byl nejdříve štěpen restričními endonukleasami BstB I, EcoR V (kap. 4.2.6.1) a poté zatupen pomocí T4 DNA polymerasy (kap. 4.2.6.3). Fragment o velikosti 7529 pb byl izolován s agarosového gelu (kap. 4.2.6.7) a ligován (kap. 4.2.6.4). Ligační směs byla následně transformována do buněk *E. coli* XL1-Blue (kap. 4.2.4) a ze získaných bakteriálních kolonií byla izolována plasmidová DNA (kap. 4.2.5.1). Správné plasmidy, pT7CT7-*malE-rtx*Δ374-854, byly nalezeny pomocí restriční analýzy a transformovány do buněk BL21/pMM100 (kap. 4.2.4), v nichž byla po kultivaci, indukci a přípravě buněčných lyzátů (kap. 4.2.7) ověřena exprese proteinu MalE-RTXΔ374-854 pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20).

Při konstrukci plasmidu pT7CT7-*malE-rtx*Δ647-854 se vycházelo z plasmidu pT7CT7ACT1/E5, který byl štěpen restričními endonukleasami Nco I, EcoR V (kap. 4.2.6.1) a zatupen pomocí T4 DNA polymerasy (kap. 4.2.6.3). Fragment o velikosti 8277 pb byl izolován z agarosového gelu (kap. 4.2.6.7) a ligován (kap. 4.2.6.4). Ligační směs byla transformována do buněk *E. coli* XL1-Blue (kap. 4.2.4) a z kolonií byla izolována plasmidová DNA (kap. 4.2.5.1), jejíž restriční analýzou byly nalezeny plasmidy pT7CT7ACT1/E5Δ647-854, nesoucí požadovanou delecí. Jeden z těchto plasmidů byl štěpen restričními endonukleasami Hind III, BstB I (kap. 4.2.6.1), defosforylován (kap. 4.2.6.2) a fragmenty byly děleny elektroforesou v agarosovém gelu (kap. 4.2.6.6). Fragment o velikosti 7093 pb byl izolován (kap. 4.2.6.7) a ligován (kap. 4.2.6.4) s fragmentem o velikosti 1182 pb, který vznikl po štěpení plasmidu pT7CT7-*malE-rtx* stejnými restričními endonukleasami, nesl gen pro MalE a byl taktéž izolován z agarosového gelu (kap. 4.2.6.7). Ligační směs byla následně transformována do buněk *E. coli* XL1-Blue (kap. 4.2.4) a ze získaných bakteriálních kolonií byla izolována plasmidová DNA (kap. 4.2.5.1). Správné plasmidy byly nalezeny pomocí restriční analýzy, označeny jako pT7CT7-*malE-rtx*Δ647-854 a transformovány do buněk BL21/pMM100 (kap. 4.2.4), v nichž byla po kultivaci, indukci a přípravě buněčných lyzátů (kap. 4.2.7) ověřena exprese proteinu MalE-RTXΔ647-854 pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20).

Při přípravě pT7CT7-*malE-rtx*Δ374-647 byl dvouřetězcový oligonukleotid BstNcoAdap (vzniklý hybridizací dvou vzájemně komplementárních syntetických oligonukleotidů BstNcoDel\_For a BstNcoDel\_Back (kap. 4.1.6)) ligován (kap. 4.2.6.4) s fragmentem o velikosti 6994 pb, který byl izolován z agarosového gelu (kap. 4.2.6.7) po štěpení plasmidu pT7CT7ACT1/E5 restrikcími endonukleasami BstB I, Xho I (kap. 4.2.6.1). Ligační směs byla transformována do buněk *E. coli* XL1-Blue (kap. 4.2.4) a z kolonií byla izolována plasmidová DNA (kap. 4.2.5.1), jejíž restrikcí analýzou byly nalezeny plasmidy pT7CT7ACT1/E5Δ374-647, nesoucí požadovanou delecí. Jeden z nalezených plasmidů byl štěpen restrikcími endonukleasami BamH I, BstB I (kap. 4.2.6.1), defosforylován (kap. 4.2.6.2) a dělen elektroforesou v agarosovém gelu (kap. 4.2.6.6). Fragment o velikosti 8154 pb byl z gelu izolován (kap. 4.2.6.7) a ligován (kap. 4.2.6.4) spolu s fragmentem o velikosti 1389 pb, který vznikl po štěpení plasmidu pT7CT7-*malE-rtx* stejnými restrikcími endonukleasami, nesl gen pro MalE a byl taktéž izolován z agarosového gelu (kap. 4.2.6.7). Ligační směs byla transformována do buněk *E. coli* XL1-Blue (kap. 4.2.4) a ze získaných kolonií byla izolována plasmidová DNA (kap. 4.2.5.1). Správné plasmidy, pT7CT7-*malE-rtx*Δ374-647, byly nalezeny pomocí restrikcí analýzy a transformovány do buněk BL21/pMM100 (kap. 4.2.4), v nichž byla po kultivaci, indukci a přípravě buněčných lyzátů (kap. 4.2.7) ověřena exprese proteinu MalE-RTXΔ374-647 pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20).

Z připravených plasmidů byly v následující části práce (kap. 5.1.3) exprimovány proteiny, jejichž schématické znázornění je na Obr. 19.



Obr. 19: Schématické znázornění ACT a z něj odvozených proteinů nesoucích místo AC domény celistvý protein MalE a popřípadě delece v hydrofobní doméně RTX hemolysinu. (A) ACT, resp. ACT/E5; (B) MalE-RTX, (C) MalE-RTX $\Delta$ 374-647; (D) MalE-RTX $\Delta$ 647-854; (E) MalE-RTX $\Delta$ 374-854.

### 5.1.2.3 Konstrukce plasmidu nesoucího gen pro MalE ve fúzi se sekvencí kódující C-terminální histidinovou kotvu

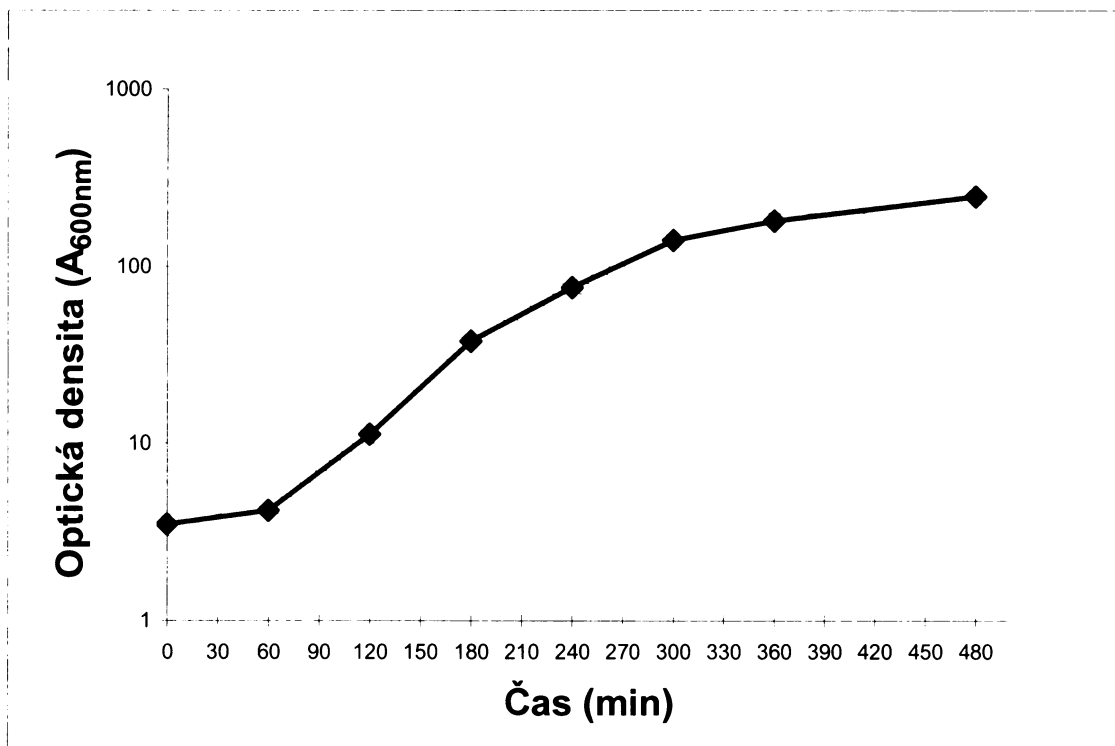
Pro produkci kontrolního volného proteinu MalE byl připraven plasmid pET28-*malE*-C-His. V prvním kroku byl dvouřetězcový oligonukleotid HindXhoAdap (vzniklý hybridizací vzájemně komplementárních syntetických oligonukleotidů HindXhoAdap\_For a HindXhoAdap\_Back (kap. 4.1.6)) ligován (kap. 4.2.6.4) s fragmentem o velikosti 5353 pb, který byl izolován z agarosového gelu (kap. 4.2.6.7) po štěpení plasmidu pET28b (kap. 4.1.8) restrikními endonukleasami Hind III a Xho I (kap. 4.2.6.1). Ligační směs byla transformována do buněk *E. coli* XL1-Blue (kap. 4.2.4) a z kolonií byla izolována plasmidová DNA (kap. 4.2.5.1), jejíž restrikní analýzou byly nalezeny plasmidy pET28-HindXhoAdap, nesoucí unikátní zásahové místo pro restrikní endonukleasu BstB I. Jeden z plasmidů pET28-HindXhoAdap byl štěpen restrikními endonukleasami Xba I, BstB I (kap. 4.2.6.1), defosforylován (kap. 4.2.6.2) a dělen elektroforesou v agarosovém gelu (kap. 4.2.6.6). Fragment o velikosti 5365 pb byl z gelu izolován (kap. 4.2.6.7) a ligován (kap. 4.2.6.4) s fragmentem o velikosti 1158 pb, který vznikl po štěpení plasmidu pT7CT7-*malE*-*rtx* stejnými restrikními endonukleasami, nesl gen *malE* a byl taktéž izolován z agarosového gelu

(kap. 4.2.6.7). Ligační směs byla transformována do buněk *E. coli* XL1-Blue (kap. 4.2.4) a ze získaných kolonií byla izolována plasmidová DNA (kap. 4.2.5.1). Plasmidy pET28-*malE*-C-His, nesoucí gen pro MalE fúzovaný se sekvencí kódující histidinovou kotvu (6×His), byly nalezeny pomocí restriční analýzy a transformovány do buněk *E. coli* BL21(λDE3) (kap. 4.2.4) nesoucích gen pro T7 RNA polymerasu a umožňujících tak produkci proteinu MalE-C-His z genu pod kontrolou T7 promotoru. Z buněk byly po kultivaci a indukci připraveny buněčné lyzáty (kap. 4.2.7), v nichž byla exprese proteinu MalE-C-His ověřena pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20).

### **5.1.3 Fermentační příprava a purifikace fúzního rekombinantního MalE-RTX, jeho delečních variant, kontrolního volného MalE-C-His a ACT/E5**

Pro produkci bakteriální biomasy velkého objemu za řízených podmínek a předpokládané vysoké hladiny produkovaných variant ACT, resp. volného MalE, bylo použito kultivace ve fermentoru s konečným objemem 5 l (kap. 4.2.9.1). Proteiny byly produkovány z plasmidů pT7CT7-*malE*-*rtx*, pT7CT7-*malE*-*rtx*Δ*cyaC*, pT7CT7ACT1/E5, pT7CT7-*malE*-*rtx*Δ374-647, pT7CT7-*malE*-*rtx*Δ647-854 a pT7CT7-*malE*-*rtx*Δ374-854 v buňkách BL21/pMM100 a z plasmidu pET28-*malE*-C-His v buňkách *E. coli* BL21 (λDE3). Po proběhlé kultivaci ve fermentoru (kap. 4.2.9.1), jejíž typický průběh je znázorněn na Obr. 20, byla z napěstovaných buněk izolována inkluzní tělíska a připraveny močovinnové extrakty (kap. 4.2.9.2), v nichž byla přítomnost příslušných proteinů ověřena pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20). Jedinou výjimkou při zpracování byly buňky produkující protein MalE-C-His, z nichž byl připraven cytosolický extrakt (kap. 4.2.13.2).





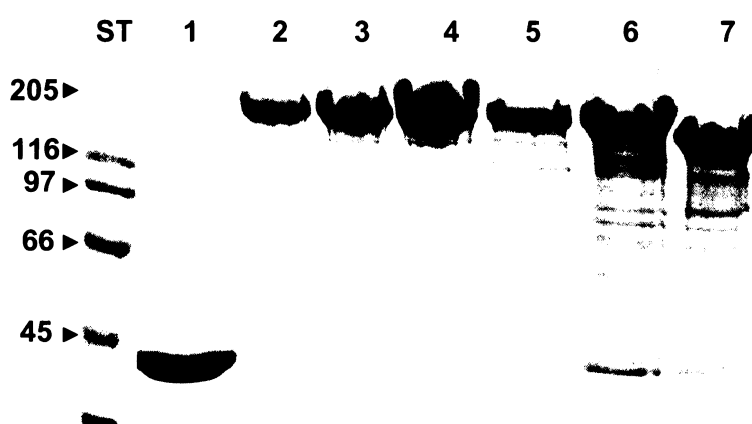
Obr. 20: **Růstová křivka buněk produkujících MalE-RTX.** Graf reprezentuje typický průběh růstu bakteriální biomasy buněk BL21/pMM100, v tomto případě transformovaných plasmidem pT7CT7-*malE-rtx*, při kultivaci ve fermentoru. Na ose x je uveden čas v minutách, na ose y je v logaritmické škále vynesena optická hustota bakteriální biomasy měřená při vlnové délce 600 nm.

Proteiny MalE-RTX, MalE-RTX $\Delta$ CyaC a ACT/E5 byly poté purifikovány ve tříkrokovém purifikačním schématu sestávajícím z gravitační iontoměničové chromatografie na DEAE-Sepharose (kap. 4.2.9.3), dále chromatografií na hydroxyapatitu (kap. 4.2.9.4) a v posledním kroku na koloně plněné hydrofobní Phenyl-Sepharosou s využitím odmytí zbytkového LPS bakteriální stěny pomocí 60% isopropanolu (kap. 4.2.9.6). Všechny deleční varianty MalE-RTX byly purifikovány rovněž pomocí gravitační iontoměničové chromatografie na DEAE-Sepharose (kap. 4.2.9.3) a chromatografií na hydroxyapatitu (kap. 4.2.9.4). K závěrečnému zakoncentrování proteinu a odmytí LPS bylo ale oproti výše uvedenému schématu využito gravitační iontoměničové chromatografie na DEAE-Sepharose v přítomnosti 60% isopropanolu (kap. 4.2.9.3). Chromatografie na Phenyl-Sepharose nebyla použita,

neboť v důsledku delecí v oblasti hydrofobní domény dochází k výraznému poklesu afinity ACT k této hydrofobní matici a purifikace touto metodou tedy není prakticky proveditelná.

Protein MalE-C-His byl purifikován afinitní chromatografií na amylose (kap. 4.2.13.6), ke které má afinitu MalE, dále chromatografií na Ni-NTA agarose, ke které má afinitu histidinová kotva (kap. 4.2.13.3) a nakonec na Phenyl-Sepharose (kap. 4.2.9.6), na níž byl vzorek převeden do pufru obsahujícího 8 M močovinu.

Jednotlivé purifikační kroky byly sledovány pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20) a čistotu všech výsledných proteinových produktů pak reprezentuje Obr. 21.



Obr. 21: **Elektroforetická analýza výsledných purifikovaných proteinů.** Alikvoty proteinů po všech purifikačních krocích byly děleny pomocí 7,5% SDS-PAGE a gel byl barven Coomassie Blue. (1) MalE-C-His; (2) MalE-RTX $\Delta$ CyaC; (3) MalE-RTX; (4) ACT/E5; (5) MalE-RTX $\Delta$ 374-647; (6) MalE-RTX $\Delta$ 647-854; (7) MalE-RTX $\Delta$ 374-854; (ST) standard molekulových hmotností (kDa).

Z hodnot absorbancí kalibračního standardu (hovězí sérový albumin) byla sestrojena kalibrační křivka, podle níž byly stanoveny koncentrace purifikovaných proteinů (Tab. 3) (kap. 4.2.21). Dále bylo vzhledem k povaze experimentů, pro něž byly proteiny připravovány (kap. 5.1.4) provedeno ve vzorcích purifikovaných proteinů také stanovení koncentrace lipopolysacharidu (kap. 4.2.10) (Tab. 3).

Tab. 3: Seznam purifikovaných proteinů s uvedením jejich koncentrací, koncentrace lipopolysacharidu a celkového množství získaného proteinu po všech purifikačních krocích.

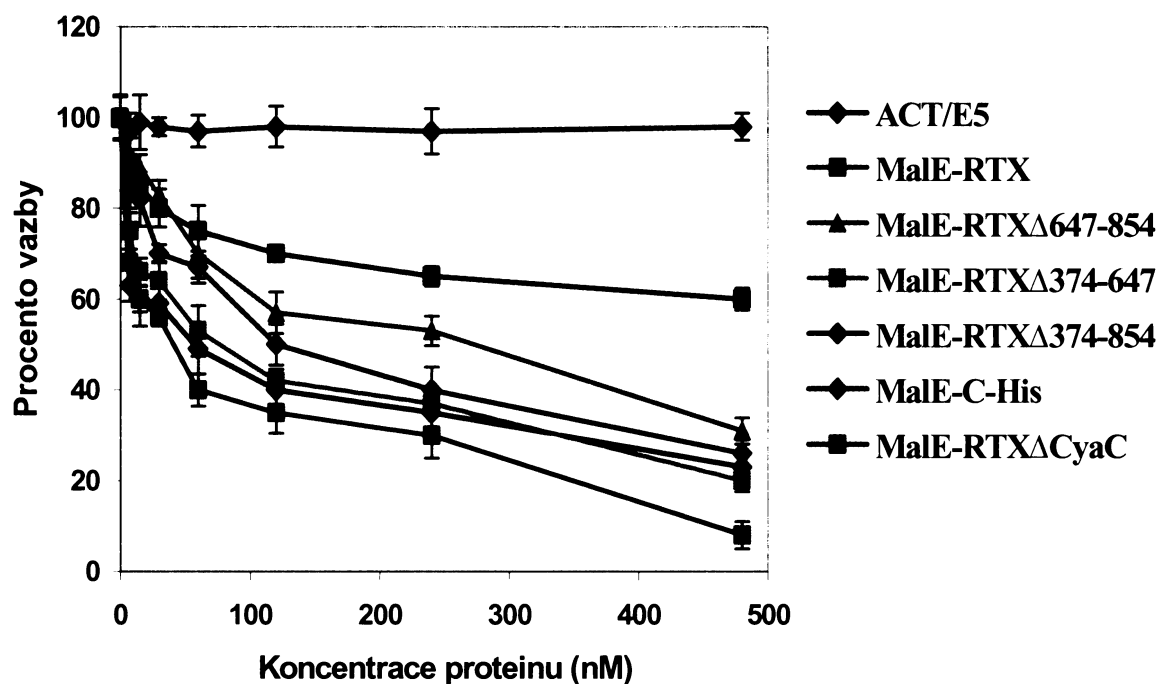
Protein	Koncentrace (mg/ml)	Molární koncentrace (μmol/l)	Koncentrace LPS (EU/mg)	Celkové množství získaného proteinu (ml)
MalE-C-His	1	23,7	94	10
MalE-RTXΔCyaC	1	5,6	75	5
MalE-RTX	1	5,6	220	9
ACT/E5	1	5,6	223	15
MalE-RTXΔ374-647	0,6	3,8	200	2,5
MalE-RTXΔ647-854	0,7	4,4	220	4
MalE-RTXΔ374-854	0,7	5,2	190	4

#### 5.1.4 Imunologické využití purifikovaných proteinů

Jak již bylo řečeno v úvodu kapitoly 5.1.2, měly být všechny výše připravené purifikované proteiny využity k zodpovězení otázky, zda je RTX hemolysinová část ACT schopna dopravovat do APC celý protein MalE (42 kDa), a ne pouze jeho přesně definovaný CD4<sup>+</sup> T-buněčný epitop (NGKLIAYPIAVEALS) sestávající z několika aminokyselinových zbytků, jak bylo ukázáno dříve (85). Navíc měla být objasněna role hydrofobní domény ACT v dopravě fúze MalE-RTX do APC pro následnou prezentaci na MHC glykoproteinech II. třídy.

U purifikovaných proteinů bylo nejdříve testováno, zda jsou schopny specifické vazby na buňky CHO (Chinese Hamster Ovary cell line) exprimující na svém povrchu integrinový receptor CD11b/CD18 (CHO-CD11b/CD18). Byly provedeny *in vitro* kompetiční experimenty, ve kterých byla testována schopnost jednotlivých

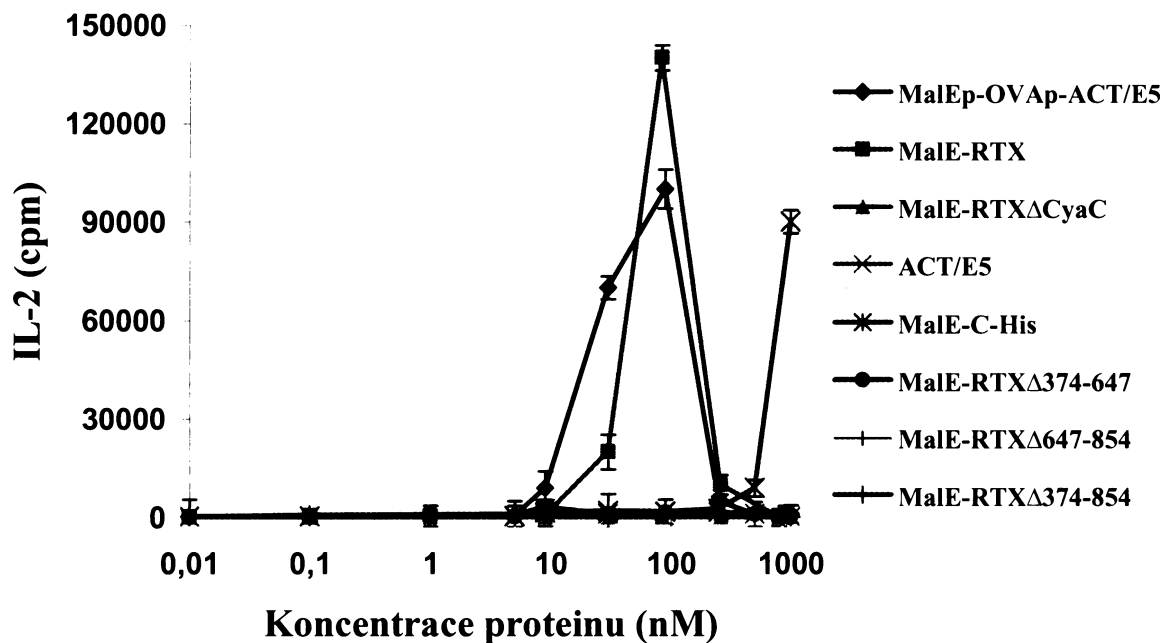
proteinů soutěžit o vazbu k integrinovému receptoru CD11b/CD18 s molekulou ACT značenou biotinem (kap. 4.2.11). Získané výsledky jsou shrnuty na Obr. 22, z něhož je zřejmé, že fúzní protein MalE-RTX má stejné vazebné schopnosti jako původní nepozměněný protein, ACT/E5. Stejně tak jeho deleční varianta MalE-RTX $\Delta$ 374-647 se váže na povrch CHO-CD11b/CD18 buněk se stejnou afinitou jako původní ACT/E5. Další dvě deleční varianty, MalE-RTX $\Delta$ 647-854 a MalE-RTX $\Delta$ 374-854, však již vykazovaly sníženou schopnost vazby, stejně tak jako neacylovaný MalE-RTX $\Delta$ CyaC. Kontrolní volný MalE-C-His protein nebyl schopen vazby na integrinový receptor vůbec. Uvedené výsledky naznačují, že záměnou AC domény ACT za MalE nedochází k takové konformační změně v RTX hemolysinové části molekuly (nesoucí receptor vazebné místo), která by měla za následek sníženou schopnost vazby fúzního proteinu na integrinový receptor CD11b/CD18. Nicméně k vazbě ACT na molekulu integrinu je důležitá oblast RTX hemolysinu mezi aminokyselinovými zbytky 647-854, neboť její delecí dochází k signifikantnímu poklesu vazby fúzního proteinu k CD11b/CD18.



Obr. 22: **Koncentrační závislost vazby MalE-RTX a jeho derivátů na integrinový receptor CD11b/CD18.** Buňky CHO-CD11b/CD18 byly inkubovány s indikovanými koncentracemi fúzního proteinu MalE-RTX a jeho delečních variant. Jako pozitivní kontrola byl do experimentu zařazen detoxifikovaný

protein ACT/E5 a jako negativní kontroly pak volný protein MalE-C-His a neacylovaný MalE-RTX $\Delta$ CyaC. Po 30 minutové inkubaci byl přidán biotinylovaný ACT (30 nM) a intenzita jeho vazby byla stanovena průtokovou cytometrií po značení streptavidin-fykoerytrinem.

V dalším kroku byla studována schopnost fúzního proteinu MalE-RTX a jeho jednotlivých delečních variant dopravovat protein MalE do APC pro následnou prezentaci jeho CD4<sup>+</sup> T-buněčného epitopu (NGKLIAYPIAVEALS) na molekulách MHC II. třídy (kap. 4.2.12). Výsledky jednotlivých experimentů pro protein MalE-RTX, jeho deleční varianty i všechny kontrolní proteiny jsou znázorněny na Obr. 23. Z něj je zřejmé, že i přes substituci celé AC domény proteinem MalE (MalE-RTX), zůstává schopnost RTX hemolysinové části ACT dopravovat celý MalE protein do APC zachována a následná prezentace CD4<sup>+</sup> T-buněčného epitopu odvozeného z MalE na molekulách MHC II. třídy je stejná jako by byl k prezentaci dopravován molekulou ACT pouze tento CD4<sup>+</sup> T-buněčný epitop samostatně (MalEp-OVAp-ACT/E5). Na druhé straně, žádná z delečních variant proteinu MalE-RTX, ani jeho neacylovaná forma (MalE-RTX $\Delta$ CyaC) nebyly schopny dopravovat MalE k prezentaci prostřednictvím MHC II. třídy. Kontrolní protein MalE-C-His byl schopen prezentace CD4<sup>+</sup> T-buněčného epitopu se 100-násobně nižší účinností, než fúze MalE-RTX a kontrolní protein ACT/E5 byl na úrovni pozadí experimentu, neboť ve své molekule nenese žádný MalE T-buněčný epitop.



Obr. 23: **Prezentace CD4<sup>+</sup> T-buněčného epitopu odvozeného z proteinu MalE na molekulách MHC II. třídy po jeho dopravě do APC pomocí MalE-RTX a jeho derivátů.** Jako APC byly použity slezinné buňky z C57BL/6 myši, které byly inkubovány s indikovanými koncentracemi proteinu MalE-RTX, jeho delečních variant a příslušných kontrolních proteinů. Tyto APC byly kokultivovány s anti-MalE CD4<sup>+</sup> T-buněčnými hybridomy (CRMC3), které jsou schopny specificky rozpoznávat komplexy molekul MHC II. třídy s navázaným MalE epitopem na povrchu APC, a jejichž následná stimulace vede k uvolňování IL-2 do supernatantu. Množství uvolněného IL-2 je pak stanoveno jako množství inkorporovaného [<sup>3</sup>H]thymidinu do cytotoxických T-lymfocytů (CTLL), jejichž proliferace je úměrná koncentraci IL-2 v supernatantu.

Všechny výsledky prezentované v této kapitole byly získány ve spolupracující laboratoři Prof. C. Leclerc (Pasteurův ústav, Paříž).

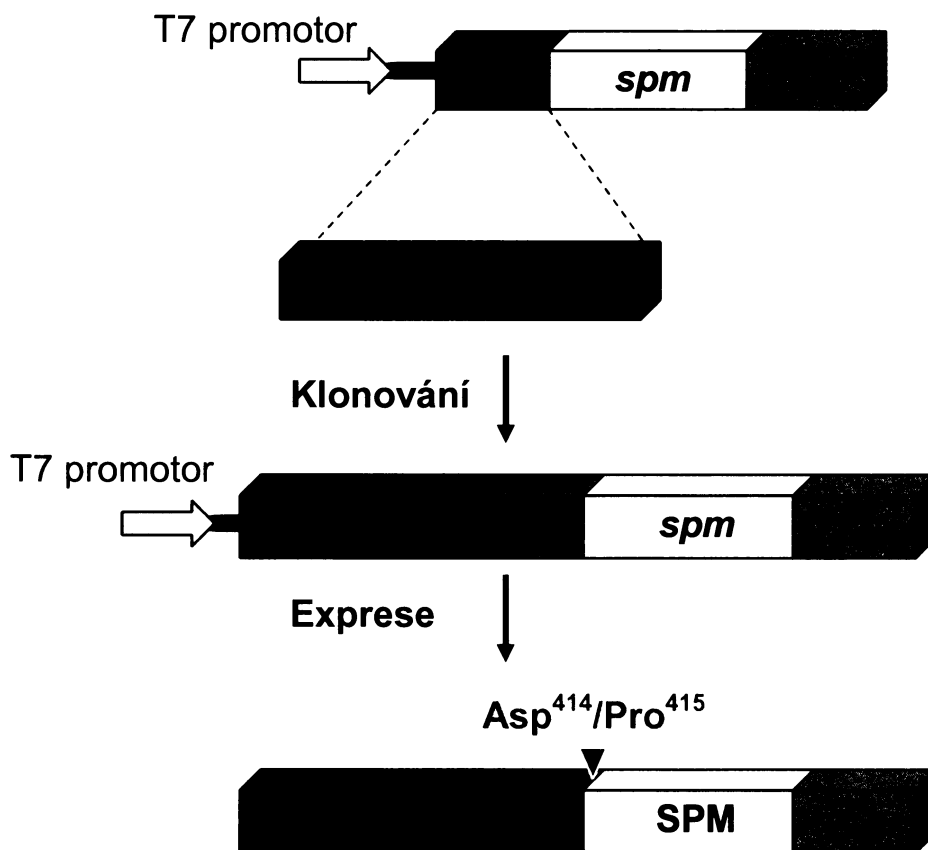
## 5.2 Výsledky studia proteinu FrpC

Cílem této části diplomové práce bylo zjistit, zda je možné využít samoštěpitelný modul (SPM) proteinu FrpC (kap. 2.2.3) ke konstrukci nového typu samoštěpitelné afinitní kotvy a následné purifikaci rozpustných rekombinantních proteinů. K tomuto účelu byla zkonstruována řada plasmidů, v nichž byla sekvence kódující SPM fúzována na svém 5'-konci s geny kódujícími různé rekombinantní proteiny a na svém 3'-konci pak se sekvencemi kódujícími různé afinitní kotvy, umožňující vazbu připravených fúzních proteinů na příslušné afinitní matrice a jejich purifikaci. Na fúzních proteinech pak bylo testováno (v roztoku či po vazbě na matrici), zda je SPM po indukci štěpení vápenatými ionty schopen odštěpovat rekombinantní proteiny, byly hledány podmínky, při nichž je účinnost tohoto štěpení nejvyšší a bylo sledováno, zda je u odštěpených rekombinantních proteinů (enzymů) zachována jejich enzymatická aktivita. Takto bylo charakterizováno několik velikostně i vlastnostmi odlišných rekombinantních proteinů, aby bylo možné konstatovat, že zde studovaný purifikační systém může být použit jako plnohodnotná alternativa systémů stávajících.

### 5.2.1 Konstrukce expresních vektorů pro produkci fúzních proteinů nesoucích samoštěpitelnou afinitní kotvu založenou na SPM proteinu FrpC

Pro snadné klonování genu pro libovolný rekombinantní protein určený k purifikaci pomocí samoštěpitelné kotvy založené na SPM proteinu FrpC byly připraveny dva typy vektorů, pTYB2-MCS-SPM-CBD a pET28-MCS-SPM-C-His. Oba nesou stejné polyklonovací místo (Multiple Cloning Site, MCS) s unikátními zásahovými místy pro několik restričních endonukleas (Nde I, Kpn I, Sac II, EcoR I, Sma I, Sac I, Sal I, Nhe I), do nichž může být gen pro rekombinantní protein klonován tak, aby byl ve fázi čtení se sekvencí kódující SPM a afinitní kotvu, kterou je v případě vektoru pTYB2-MCS-SPM-CBD chitin-vázající doména (CBD) a v případě vektoru pET28-MCS-SPM-C-His šest histidinových zbytků (C-His). Exprese fúzních proteinů je u obou vektorů pod kontrolou T7 promotoru a ribosom-vazebného místa genu 10

bakteriofága T7. Obecné schéma klonování genu pro rekombinantní protein do vektoru pTYB2-MCS-SPM-CBD nebo pET28-MCS-SPM-C-His je znázorněno na Obr. 24.



Obr. 24: **Obecné schéma klonování genu pro rekombinantní protein do vektoru pTYB2-MCS-SPM-CBD nebo do vektoru pET28-MCS-SPM-C-His, z nichž je poté exprimován rekombinantní protein ve fúzi s SPM a afinitní kotvou.** Gen pro SPM je na svém 5'-konci fúzován ve fázi čtení s genem *X* pro libovolný rekombinantní protein. Tento gen je vkládán do klonovacího místa (MCS) vektoru pTYB2-MCS-SPM-CBD nebo pET28-MCS-SPM-C-His. Na svém 3'-konci je gen pro SPM fúzován ve fázi čtení se sekvencemi kódujícími jednotlivé afinitní kotvy (CBD nebo C-His). Expresse fúzních proteinů je pod kontrolou T7 promotoru a ribosom-vazebného místa genu 10 bakteriofága T7. Červeným písmem jsou zvýrazněny zbytky  $Asp^{414}$  a  $Pro^{415}$ , mezi nimiž dochází po indukci vápenatými ionty ke štěpení fúzního proteinu (pro snazší orientaci odpovídá použité číslování umístění vazby v sekvenci původního proteinu FrpC). Odštěpený rekombinantní protein pak na svém C-konci nese navíc pouze jediný aspartátový zbytek ( $Asp^{414}$ ) pocházející z SPM.



Vektor pTYB2-MCS-SPM-CBD byl konstruován již dříve (kap. 4.1.8).

Vektor pET28-MCS-SPM-C-His byl připraven z plasmidu pET28b-SPM-C-His (kap. 4.1.8), který byl štěpen pomocí restričních endonukleas Xba I, Hind III (kap. 4.2.6.1), defosforylován (kap. 4.2.6.2) a po dělení vzniklých fragmentů pomocí agarosové elektroforesy (kap. 4.2.6.6) byl z gelu izolován fragment (kap. 4.2.6.7) o velikosti 5272 pb. Ten byl následně ligován (kap. 4.2.6.4) s fragmentem o velikosti 730 pb, který byl izolován z agarosového gelu (kap. 4.2.6.7) po elektroforetickém dělení fragmentů (kap. 4.2.6.6) vzniklých štěpením vektoru pTYB2-MCS-SPM-CBD stejnými endonukleasami (kap. 4.2.6.1). Ligační směs byla transformována do buněk *E. coli* XL1-Blue (kap. 4.2.4) a z kolonií byla izolována plasmidová DNA (kap. 4.2.5.1). Správné plasmidy byly nalezeny pomocí restriční analýzy a označeny jako pET28-MCS-SPM-C-His.

Oba tyto vektory byly úspěšně použity ke konstrukci několika plasmidů popsaných v dalších kapitolách.

#### **5.2.1.1 Příprava konstruktů pro expresi fúzních proteinů použitých k základní charakterizaci SPM-zprostředkovaného štěpení**

Pro základní charakterizaci SPM-zprostředkovaného štěpení fúzních proteinů v roztoku (kap. 5.2.3) nebo po jejich vazbě na afinitní matici (kap. 5.2.4) byly připraveny následující konstrukty: pTYB2-*malE*-SPM-CBD, pTYB2-GST-SPM-CBD, pET28-GST-SPM-C-His a pTYB2-*frpC* $\Delta$ *rtx-int*-CBD.

Při konstrukci pTYB2-*malE*-SPM-CBD bylo využito vektoru pTYB2-MCS-BstAdap-SPM-CBD (kap. 4.1.8). Ten byl štěpen restričními endonukleasami Nde I, BstB I (kap. 4.2.6.1), defosforylován (kap. 4.2.6.2) a vzniklé fragmenty byly děleny elektroforesou v agarosovém gelu (kap. 4.2.6.6), z něhož byl izolován (kap. 4.2.6.7) fragment o velikosti 6612 pb. Ten byl ligován (kap. 4.2.6.4) s fragmentem o velikosti 1118 pb nesoucím gen *malE*, který vznikl po štěpení plasmidu pT7CT7-*malE-rtx*- $\Delta$ *cyaC* (kap. 5.1.2.2) stejnými restričními endonukleasami (kap. 4.2.6.1) a byl taktéž izolován z agarosového gelu (kap. 4.2.6.7). Ligační směs byla následně transformována do buněk *E. coli* XL1-Blue (kap. 4.2.4) a ze získaných bakteriálních kolonií byla izolována plasmidová DNA (kap. 4.2.5.1). Správné plasmidy byly nalezeny pomocí

restrikční analýzy a transformovány do buněk BL21( $\lambda$ DE3) (kap. 4.2.4), v nichž byla po kultivaci, indukci a přípravě buněčných lyzátů (kap. 4.2.7) ověřena exprese proteinu MalE-SPM-CBD pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20).

Při konstrukci plasmidu pET28-GST-SPM-C-His, stejně tak jako plasmidu pTYB2-GST-SPM-CBD, byl nejprve štěpen plasmid pET42b restrikčními endonukleasami Spe I, BsrG I (kap. 4.2.6.1), vzniklé fragmenty byly děleny pomocí agarosové elektroforesy (kap. 4.2.6.6) a následně byl izolován fragment o velikosti 5760 pb (kap. 4.2.6.7). Ten byl ligován (kap. 4.2.6.4) se syntetickým dvouřetězcovým oligonukleotidem (vzniklým hybridizací dvou vzájemně komplementárních syntetických oligonukleotidů GST\_For a GST\_Back (kap. 4.1.6)) nesoucím zásahové místo pro enzym Nhe I. Ligační směs byla transformována do buněk *E. coli* XL1-Blue (kap. 4.2.4), z nichž byla poté izolována plasmidová DNA (kap. 4.2.5.1) a provedena restrikční analýza pomocí restrikční endonukleasy Nhe I pro ověření přítomnosti syntetického oligonukleotidu. Z nově vzniklého plasmidu pET42b-GSToligo byl vyjmut gen pro glutathion-S-transferasu štěpením uvedeného plasmidu restrikčními endonukleasami Nde I, Nhe I (kap. 4.2.6.1). Po separaci elektroforesou v agarosovém gelu (kap. 4.2.6.6) a následné izolaci (kap. 4.2.6.7) byl získán fragment o velikosti 679 pb, který byl ligován (kap. 4.2.6.4) s fragmentem o velikosti 5957 pb, resp. fragmentem o velikosti 6598 pb. Ty byly izolovány z agarosového gelu (kap. 4.2.6.7) po elektroforetickém dělení (kap. 4.2.6.6) defosforylovaných (kap. 4.2.6.2) fragmentů vzniklých štěpením vektoru pET28-MCS-SPM-C-His, resp. pTYB2-MCS-SPM-CBD restrikčními endonukleasami Nde I, Nhe I (kap. 4.2.6.1). Ligační směsi byly transformovány do buněk *E. coli* XL1-Blue (kap. 4.2.4) a správné klony nesoucí pET28-GST-SPM-C-His, resp. pTYB2-GST-SPM-CBD byly po izolaci plasmidové DNA (kap. 4.2.5.1) identifikovány pomocí restrikční analýzy. Ty byly poté transformovány do buněk *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) (kap. 4.2.4), v nichž byla po kultivaci, indukci a přípravě buněčných lyzátů (kap. 4.2.7) ověřena exprese proteinu GST-SPM-C-His, resp. GST-SPM-CBD pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20).

Při přípravě plasmidu pTYB2-*frpC* $\Delta$ *Artx-int*-CBD, z něhož bude exprimován a následně purifikován kontrolní protein FrpC $\Delta$ RTX, byl pomocí restrikčních endonukleas EcoR V, Xba I (kap. 4.2.6.1) štěpen plasmid pTYB2-*frpC-int*-CBD (kap. 4.1.8). Vzniklé fragmenty byly děleny elektroforesou v agarosovém gelu (kap. 4.2.6.6),

z kterého byl izolován (kap. 4.2.6.7) fragment o velikosti 2627 pb. Zároveň byl štěpen pomocí restričních endonukleas Xba I a Sma I (kap. 4.2.6.1) plasmid pTYB2 (kap. 4.1.8), přičemž po defosforylaci (kap. 4.2.6.2), separaci elektroforesou v agarosovém gelu (kap. 4.2.6.6) a následné izolaci (kap. 4.2.6.7) byl získán fragment o velikosti 7191 pb. Po ligaci (kap. 4.2.6.4) tohoto fragmentu s fragmentem o velikosti 1973 pb byla ligační směs transformována do buněk *E. coli* XL1-Blue (kap. 4.2.4) a z vybraných kolonií byla izolována plasmidová DNA (kap. 4.2.5.1), jejíž restriční analýzou byly nalezeny správné klony nesoucí požadovanou delecí repetitivní domény proteinu FrpC. Správné plasmidy, pTYB2-*frpC*Δ*rtx-int*-CBD, byly transformovány do buněk *E. coli* BL21(λDE3) (kap. 4.2.4), v nichž byla po kultivaci, indukci a přípravě buněčných lyzátů (kap. 4.2.7) ověřena exprese proteinu FrpC-ΔRTX-int-CBD pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20).

#### **5.2.1.2 Příprava konstruktů pro expresi volných nebo k samoštěpitelné SPM-CBD afinitní kotvě fúzovaných rekombinantních enzymů**

Porovnání hodnot specifických aktivit enzymů získaných po vyštěpení z fúze s SPM-CBD s hodnotami specifických aktivit příslušných volných enzymů umožní ověřit, zda purifikace rekombinantních proteinů pomocí systému založeného na SPM neovlivňuje jejich vlastnosti (viz kap. 5.2.5). Proto byly konstruovány jednak plasmidy pro expresi rekombinantních enzymů fúzovaných s SPM-CBD (pTYB2-N-His-*cat*-SPM-CBD, pTYB2-*lacZ*-C-His-SPM-CBD), jednak kontrolní plasmidy pro expresi volných enzymů (pTYB2-N-His-*cat*, pTYB2-*lacZ*-C-His).

Při přípravě plasmidů nesoucích gen pro chloramfenikol acetyltransferasu (CAT) se vycházelo z plasmidu pET2 (kap. 4.1.8), z něhož byl PCR amplifikací (kap. 4.2.6.5) s použitím specifických syntetických oligonukleotidů (CAT\_For a CAT\_Back (kap. 4.1.6)) získán gen pro CAT. PCR produkt byl po vizualizaci a oddělení nespécifických produktů PCR reakce pomocí agarosové elektroforesy (kap. 4.2.6.6) a následné izolaci (kap. 4.2.6.7) štěpen restričními endonukleasami Nde I, Nhe I (kap. 4.2.6.1) a následně opět separován elektroforesou v agarosovém gelu (kap. 4.2.6.6), izolován (kap. 4.2.6.7) a ligován (kap. 4.2.6.4) s fragmentem o velikosti 6598 pb izolovaným z agarosového gelu (kap. 4.2.6.7) po štěpení vektoru pTYB2-MCS-SPM-CBD stejnými enzymy (kap. 4.2.6.1) a jeho defosforylaci (kap. 4.2.6.2). Po

transformaci ligační směsi do buněk *E. coli* XL1-Blue (kap. 4.2.4) byla z vybraných kolonií izolována plasmidová DNA (kap. 4.2.5.1) a následně provedena restriční analýza vedoucí k identifikaci klonů nesoucí gen pro CAT. Správně zkonstruované plasmidy, označené jako pTYB2-*cat*-SPM-CBD, byly transformovány do buněk *E. coli* BL21(λDE3) (kap. 4.2.4), v nichž byla po kultivaci, indukci a přípravě buněčných lyzátů (kap. 4.2.7) ověřena exprese proteinu CAT-SPM-CBD pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20). V dalším kroku byl ligací (kap. 4.2.6.4) syntetického oligonukleotidu nesoucího sekvenci kódující histidinovou kotvu a specifické zásahové místo pro endonukleasu Mlu I (vzniklým hybridizací dvou vzájemně komplementárních syntetických oligonukleotidů 6×His\_For a 6×His\_Back (kap. 4.1.6)) a fragmentu izolovaného z agarosového gelu (kap. 4.2.6.7) po elektroforetickém dělení (kap. 4.2.6.6) plasmidu pTYB2-*cat*-SPM-CBD linearizovaného restriční endonukleasou Nde I (kap. 4.2.6.1) připraven plasmid pTYB2-N-His-*cat*-SPM-CBD. Ligační směs byla transformována do buněk *E. coli* XL1-Blue (kap. 4.2.4), z vybraných kolonií byla izolována plasmidová DNA (kap. 4.2.5.1) a plasmidy s vloženým oligonukleotidem byly nalezeny restriční analýzou pomocí enzymu Mlu I. Aby bylo možné získat plasmidy se správnou orientací oligonukleotidu, byly všechny plasmidy s vloženým syntetickým oligonukleotidem transformovány do buněk *E. coli* BL21(λDE3) (kap. 4.2.4), u nichž byla po kultivaci, indukci a přípravě buněčných lyzátů (kap. 4.2.7) sledována exprese proteinu N-His-CAT-SPM-CBD pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20). Pokud byl oligonukleotid vložen v opačné orientaci, došlo díky přítomnosti stop kodonu na opačném vlákně oligonukleotidu k zastavení translace proteinu.

Plasmid pTYB2-N-His-*cat* pro expresi kontrolního volného CAT proteinu s N-koncovou histidinovou kotvou byl připraven z plasmidu pTYB2-N-His-*cat*-SPM-CBD. A to tak, že byl vybrán jeden plasmid, z něhož byla možná exprese proteinu N-His-CAT-SPM-CBD a do něj byl po jeho linearizaci štěpením restriční endonukleasou Nhe I (kap. 4.2.6.1), separaci elektroforesou v agarosovém gelu (kap. 4.2.6.6) a izolaci (kap. 4.2.6.7) ligován (kap. 4.2.6.4) syntetický oligonukleotid nesoucí sekvenci pro stop kodon a zásahové místo pro restriční endonukleasu BspH I (vzniklým hybridizací dvou vzájemně komplementárních syntetických oligonukleotidů STOP\_For a STOP\_Back (kap. 4.1.6)). Ligační směs byla transformována do buněk *E. coli* XL1-Blue (kap. 4.2.4), z vybraných kolonií byla izolována plasmidová DNA (kap. 4.2.5.1) a

plasmidy s vloženým oligonukleotidem byly nalezeny restriční analýzou pomocí endonukleasy BspH I. Ty byly poté transformovány do buněk *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) (kap. 4.2.4), v nichž byla po kultivaci, indukci a přípravě buněčných lyzátů (kap. 4.2.7) ověřena exprese zkrácené verze původního proteinu, N-His-CAT, pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20).

Dalším plasmidem nesoucím sekvenci kódující enzymaticky aktivní protein byl pTYB2-*lacZ*-C-His-SPM-CBD. V prvním kroku byl získán gen pro  $\beta$ -galaktosidasu fúzovaný se sekvencí kódující C-koncovou histidinovou kotvu (LacZ-C-His) z plasmidu pAc5.1/V5-His/*lacZ* (kap. 4.1.8) PCR amplifikací (kap. 4.2.6.5) s použitím specifických syntetických oligonukleotidů (*lacZ*\_For a *lacZ*\_Back (kap. 4.1.6)). Směs po PCR amplifikaci byla separována elektroforesou v agarosovém gelu (kap. 4.2.6.6) a požadovaný PCR fragment nesoucí gen pro LacZ-C-His byl izolován (kap. 4.2.6.7) a následně štěpen restričními endonukleasami Kpn I, Nhe I (kap. 4.2.6.1). V dalším kroku byl PCR fragment ligován (kap. 4.2.6.4) s fragmentem o velikosti 6607 pb izolovaným z agarosového gelu (kap. 4.2.6.7) po elektroforetickém dělení (kap. 4.2.6.6) vektoru pTYB2-MCS-SPM-CBD štěpeného taktéž restričními endonukleasami Kpn I, Nhe I (kap. 4.2.6.1), který byl navíc defosforylován (kap. 4.2.6.2). Ligační směs byla transformována do buněk *E. coli* XL1-Blue (kap. 4.2.4), z několika kolonií byla izolována plasmidová DNA (kap. 4.2.5.1) a plasmidy s vloženým genem pro LacZ-C-His byly nalezeny restriční analýzou. Ty byly transformovány do buněk *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) (kap. 4.2.4), v nichž byla po kultivaci, indukci a přípravě buněčných lyzátů (kap. 4.2.7) ověřena exprese proteinu LacZ-C-His-SPM-CBD pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20).

Plasmid pTYB2-*lacZ*-C-His pro expresi kontrolního volného LacZ proteinu s C-koncovou histidinovou kotvou byl připraven ligací (kap. 4.2.6.4) syntetického oligonukleotidu nesoucího stop kodon a zásahové místo pro restriční endonukleasu BspH I (vzniklého hybridizací dvou vzájemně komplementárních syntetických oligonukleotidů STOP\_For a STOP\_Back (kap. 4.1.6)) s fragmentem izolovaným z agarosového gelu (kap. 4.2.6.7) po elektroforetickém dělení (kap. 4.2.6.6) plasmidu pTYB2-*lacZ*-C-His-SPM-CBD linearizovaného restriční endonukleasou Nhe I (kap. 4.2.6.1). Ligační směs byla transformována do buněk *E. coli* XL1-Blue (kap. 4.2.4), z vybraných kolonií byla izolována plasmidová DNA (kap. 4.2.5.1) a přítomnost

oligonukleotidu byla ověřena pomocí restrikční analýzy enzymem BspH I. Plasmidy s vloženým oligonukleotidem byly transformovány do buněk *E. coli* BL21(λDE3) (kap. 4.2.4), v nichž byla po kultivaci, indukci a přípravě buněčných lyzátů (kap. 4.2.7) ověřena exprese proteinu LacZ-C-His pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20).

### **5.2.1.3 Příprava konstruktů pro expresi fúzních proteinů pomocí nichž bude srovnávána účinnost purifikačního systému založeného na SPM se systémem založeným na modifikovaném inteinu**

Pro srovnání účinnosti purifikačního systému založeného na SPM proteinu FrpC s komerčním systémem založeným na modifikovaném inteinu (kap. 5.2.6) byly připraveny dva plasmidy, pTYB2-*ac*-SPM-CBD a pTYB2-*ac*-int-CBD.

Při přípravě pTYB2-*ac*-SPM-CBD se vycházelo z vektoru pTYB2-MCS-SPM-CBD (kap. 5.2.1), který byl štěpen pomocí restrikčních endonukleas Xba I, Nhe I (kap. 4.2.6.1), poté byla provedena defosforylace vzniklých fragmentů (kap. 4.2.6.2) a reakční směs byla separována pomocí agarosové elektroforesy (kap. 4.2.6.6). Následně byl izolován (kap. 4.2.6.7) fragment o velikosti 6558 pb, který byl ligován (kap. 4.2.6.4) s fragmentem o velikosti 1196 pb nesoucím gen pro adenylátcyklasu (AC) izolovaným z agarosového gelu (kap. 4.2.6.7) po elektroforetickém dělení fragmentů (kap. 4.2.6.6) vzniklých štěpením plasmidu pT7CT7ACT1/BstNheAdap (kap. 4.1.8) restrikčními endonukleasami Xba I, Nhe I (kap. 4.2.6.1). Ligační směs byla transformována do buněk *E. coli* XL1-Blue (kap. 4.2.4), z vybraných kolonií byla izolována plasmidová DNA (kap. 4.2.5.1) a restrikční analýzou byly vyhledány plasmidy s vloženým genem pro AC. Ty byly poté transformovány do buněk *E. coli* BL21(λDE3) (kap. 4.2.4), z nichž byly po kultivaci a indukci připraveny buněčné lyzáty (kap. 4.2.7), ve kterých byla exprese proteinu AC-SPM-CBD ověřena pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20).

Plasmid pTYB2-*ac*-int-CBD byl připraven ligací (kap. 4.2.6.4) defosforylovaného (kap. 4.2.6.2) fragmentu o velikosti 7191 pb, který byl izolován z agarosového gelu (kap. 4.2.6.7) po elektroforetické separaci fragmentů (kap. 4.2.6.6) vzniklých štěpením vektoru pTYB2 restrikčními endonukleasami Xba I, Sma I (kap. 4.2.6.1) s fragmentem o velikosti 1193 pb izolovaným z agarosového gelu (kap. 4.2.6.7) po elektroforetickém dělení fragmentů (kap. 4.2.6.6) vzniklých štěpením plasmidu pT7CT7ACT1/SmaBstAdap (kap. 4.1.8) stejnými restrikčními endonukleasami (kap.

4.2.6.1). Ligační směs byla transformována do buněk *E. coli* XL1-Blue (kap. 4.2.4), z několika kolonií byla následně izolována plasmidová DNA (kap. 4.2.5.1) a provedena restriční analýza vedoucí k vyhledání správných plasmidů. Ty byly následně transformovány do buněk *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) (kap. 4.2.4), v nichž byla po kultivaci, indukci a přípravě buněčných lyzátů (kap. 4.2.7) ověřena exprese proteinu AC-int-CBD pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20).

## **5.2.2 Produkce proteinů v buňkách *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) a příprava cytosolických extraktů**

Pro produkci proteinů ze všech připravených plasmidů (kap. 5.2.1) bylo použito buněk *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3), které byly po transformaci příslušným plasmidem použity k přípravě 500 ml kultur (kap. 4.2.13.1). Z napěstovaných buněk byly připraveny cytosolické extrakty (kap. 4.2.13.2), v nichž byla přítomnost příslušných proteinů ověřena pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20). Cytosolické extrakty byly poté použity k purifikacím jednotlivých proteinů, jak je popsáno v následujících kapitolách.

## **5.2.3 Charakterizace SPM-zprostředkovaného štěpení purifikovaných fúzních proteinů v roztoku**

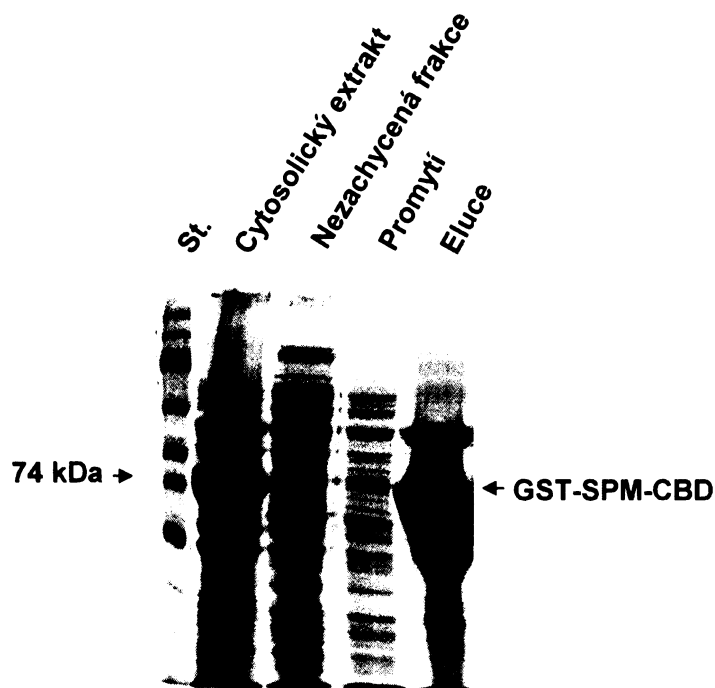
K charakterizaci SPM-zprostředkovaného štěpení fúzních proteinů v roztoku byly purifikovány následující proteiny: MalE-SPM-CBD, GST-SPM-CBD, GST-SPM-C-His a FrpC $\Delta$ RTX.

K purifikaci MalE-SPM-CBD bylo použito chromatografie na amylosové koloně (kap. 4.2.13.6), k níž má afinitu MalE část fúzního proteinu. Po odmytí kontaminujících proteinů byl fúzní protein MalE-SPM-CBD eluován TNE pufrém (kap. 4.1.5) s přidávkem maltosy o výsledné koncentraci 10 mmol/l, která byla následně odstraněna na koloně Sephadexu G-25 (kap. 4.2.13.8). Fúzní protein byl takto zároveň převeden do TNE pufru, do něhož byly převedeny i všechny ostatní proteiny, aby byly výsledky získané z měření kinetik štěpení jednotlivých proteinů vzájemně porovnatelné (kap. 4.2.15).

Protein GST-SPM-CBD, resp. GST-SPM-C-His, byl purifikován na GSH agarose (kap. 4.2.13.7), ke které má afinitu GST část fúzního proteinu. Po odmytí kontaminujících proteinů byl fúzní protein GST-SPM-CBD eluován přidavkem PBS pufru (kap. 4.1.5) s redukovanou formou glutathionu o výsledné koncentraci 5 mmol/l, který byl následně odstraněn chromatografií na Sephadexu G-25 (kap. 4.2.13.8), pomocí níž byl purifikovaný protein zároveň převeden do TNE pufru.

K purifikaci proteinu FrpC $\Delta$ RTX byla použita chromatografie na chitinové koloně (kap. 4.2.13.4), na níž bylo po odmytí kontaminujících proteinů indukováno štěpení fúzního proteinu FrpC $\Delta$ RTX-int-CBD pomocí DTT a získaný protein FrpC $\Delta$ RTX byl následně nanesen na kolonu naplněnou Sephadexem G-25 (kap. 4.2.13.8), na níž byl odstraněn DTT a protein převeden do TNE pufru.

Na Obr. 25 jsou prostřednictvím SDS-PAGE zachyceny jednotlivé kroky purifikace fúzního proteinu GST-SPM-CBD. Stejným způsobem byla provedena analýza jednotlivých purifikačních kroků všech zbývajících proteinů (data nejsou ukázána).

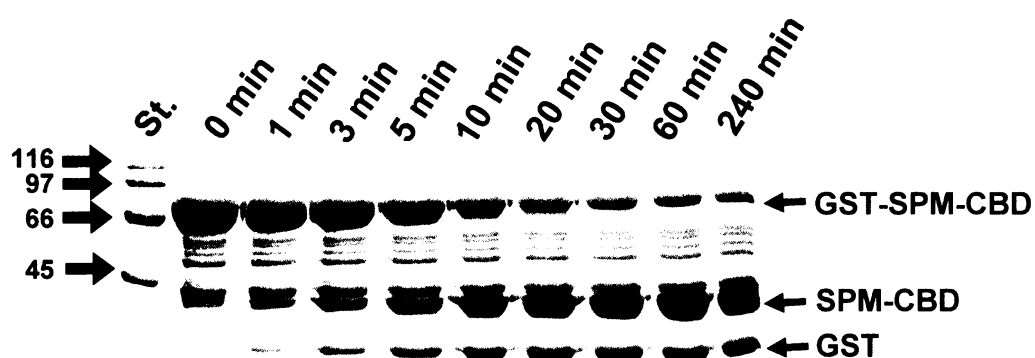


Obr. 25: **Elektroforetická analýza jednotlivých frakcí purifikace fúzního proteinu GST-SPM-CBD na GSH agarose.** Alikvoty z jednotlivých purifikačních kroků byly děleny pomocí 7,5% SDS-PAGE a gel byl barven Coomassie Blue. (St.) standard molekulových hmotností.



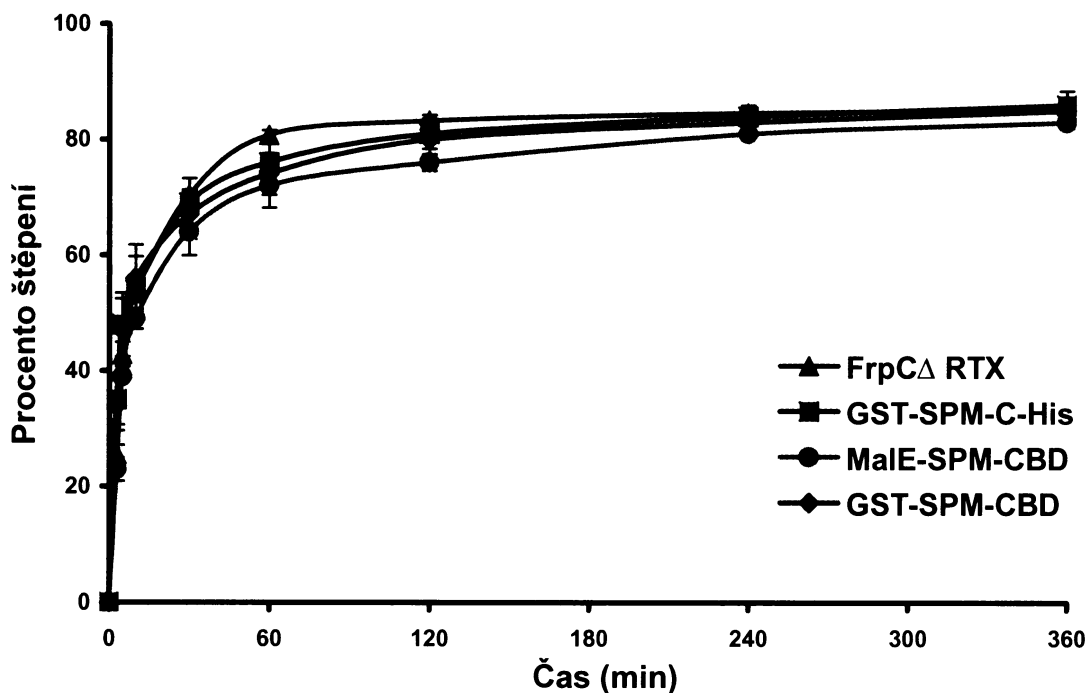
Při studiu SPM-zprostředkovaného štěpení purifikovaných fúzních proteinů bylo nejdříve sledováno, zda je SPM po indukci štěpení vápenatými ionty schopen účinně odštěpovat rekombinantní proteiny, a zda jsou kinetiky štěpící reakce jednotlivých fúzních proteinů srovnatelné s kinetikou štěpení původního proteinu FrpC $\Delta$ RTX. FrpC $\Delta$ RTX je deleční variantou proteinu FrpC, nesoucí prvních 862 aminokyselinových zbytků a postrádající C-koncovou RTX doménu, přičemž má tato deleční varianta stejné štěpící schopnosti jako celistvý protein FrpC (112).

K tomuto účelu byly purifikované fúzní proteiny MalE-SPM-CBD, GST-SPM-CBD, GST-SPM-C-His a kontrolní protein FrpC $\Delta$ RTX preinkubovány při 37 °C a štěpení vazby Asp<sup>414</sup>/Pro<sup>415</sup> bylo indukováno přidavkem vápenatých iontů o výsledné koncentraci 2 mmol/l. V časech 0, 1, 3, 5, 10, 20, 30, 60 a 240 minut byly odebrány alikvoty, v nichž byla štěpící reakce zastavena přidavkem vzorkového pufru pro SDS-PAGE s 50 mM EDTA a produkty štěpení byly děleny pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.15) a následně kvantifikovány pomocí densitometrické analýzy (kap. 4.2.16). Experiment byl opakován pro každý z fúzních proteinů celkem čtyřikrát. Na Obr. 26 je jako příklad uveden polyakrylamidový gel barvený Coomassie Blue s rozdělenými produkty štěpení fúzního proteinu GST-SPM-CBD a skenovaný pro účely densitometrické analýzy. Stejným způsobem byla analýza provedena i u všech zbývajících proteinů (data nejsou ukázána). Data získaná z výsledků densitometrické analýzy byla statisticky vyhodnocena a kinetiky štěpení jednotlivých proteinů jsou vyneseny v grafu na Obr. 27.



Obr. 26: **Závislost vápníkem indukovaného štěpení proteinu GST-SPM-CBD na čase.** Purifikovaný fúzní protein GST-SPM-CBD byl štěpen při 37 °C

v přítomnosti 2 mmol/l koncentrace vápenatých iontů a v indikovaných časech byly odebrány alikvoty, v nichž byla štěpící reakce zastavena přidávkem vzorkového pufru pro SDS-PAGE s 50 mM EDTA. Produkty štěpení byly děleny pomocí 10% SDS-PAGE a po barvení gelu Coomassie Blue kvantifikovány pomocí densitometrické analýzy. (St.) standard molekulových hmotností (kDa).



Obr. 27: **Závislost vápníkem indukovaného štěpení jednotlivých proteinů na čase.** Data získaná po densitometrické analýze produktů štěpení jednotlivých proteinů byla statisticky vyhodnocena a kinetiky štěpení jednotlivých proteinů jsou vyneseny v grafu. Každý bod grafu byl získán ze čtyř různých stanovení a je prezentován jako průměrná hodnota  $\pm$  standardní odchylka.

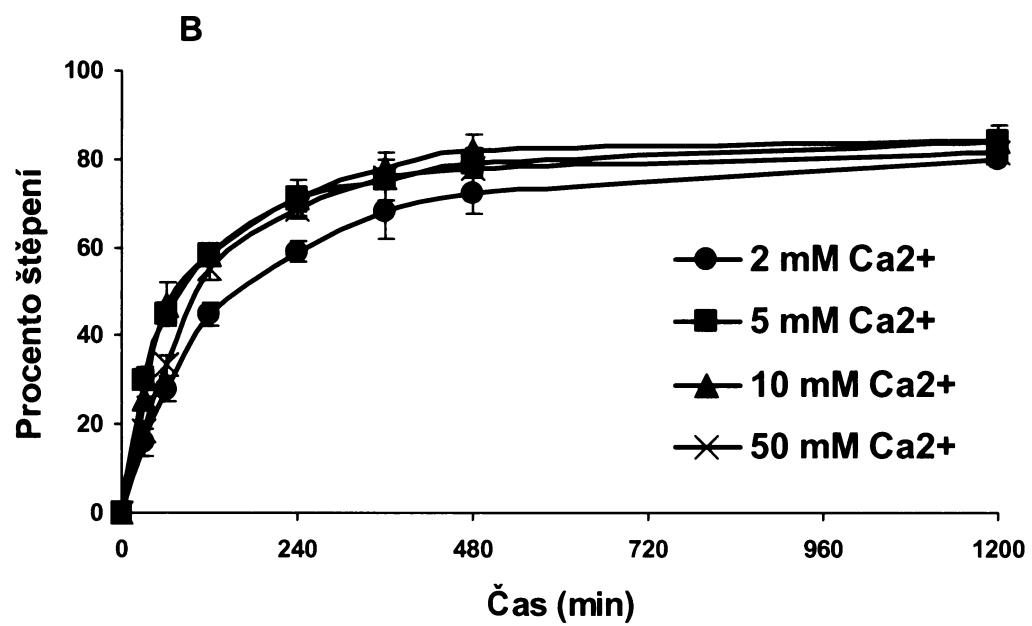
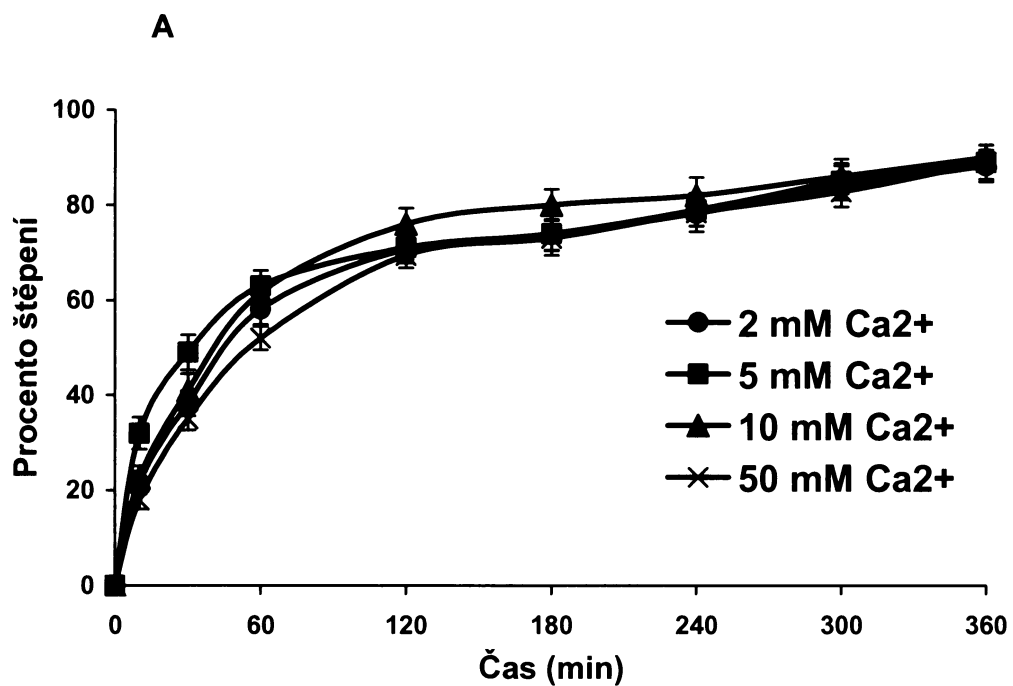
Ze získaných výsledků je zřejmé, že ke štěpení všech fúzních proteinů dochází s poločasem přibližně 5 minut, a že maximální konverze, která se v závislosti na typu fúzního proteinu pohybuje mezi 70 – 80 %, je dosaženo během dvou hodin. Výsledky navíc ukazují, že za daných podmínek dochází ke štěpení všech fúzních proteinů se stejnou či velmi podobnou účinností jako ke štěpení původního proteinu FrpC $\Delta$ RTX.

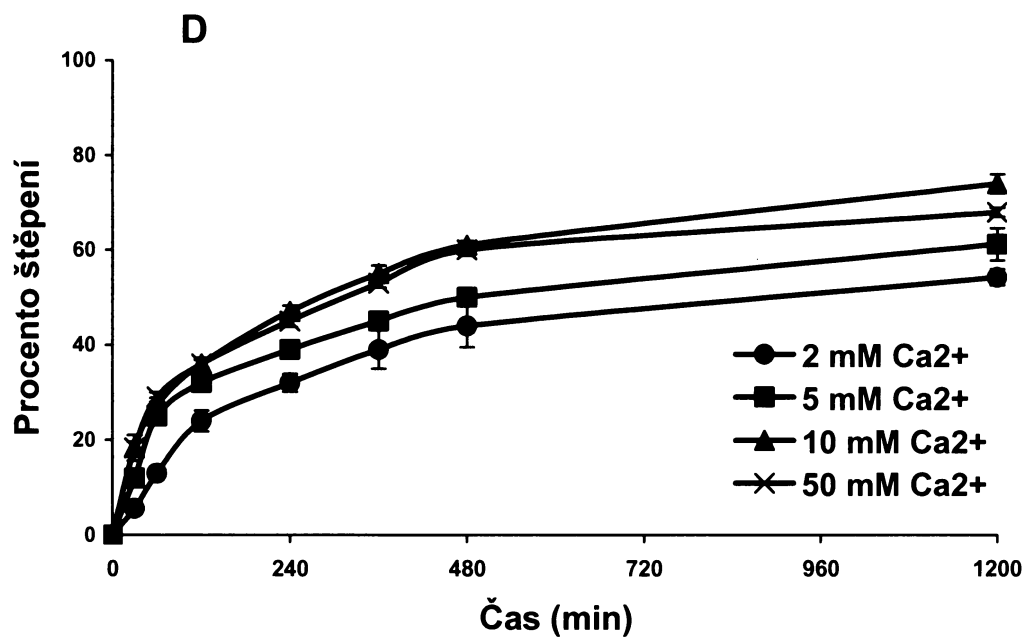
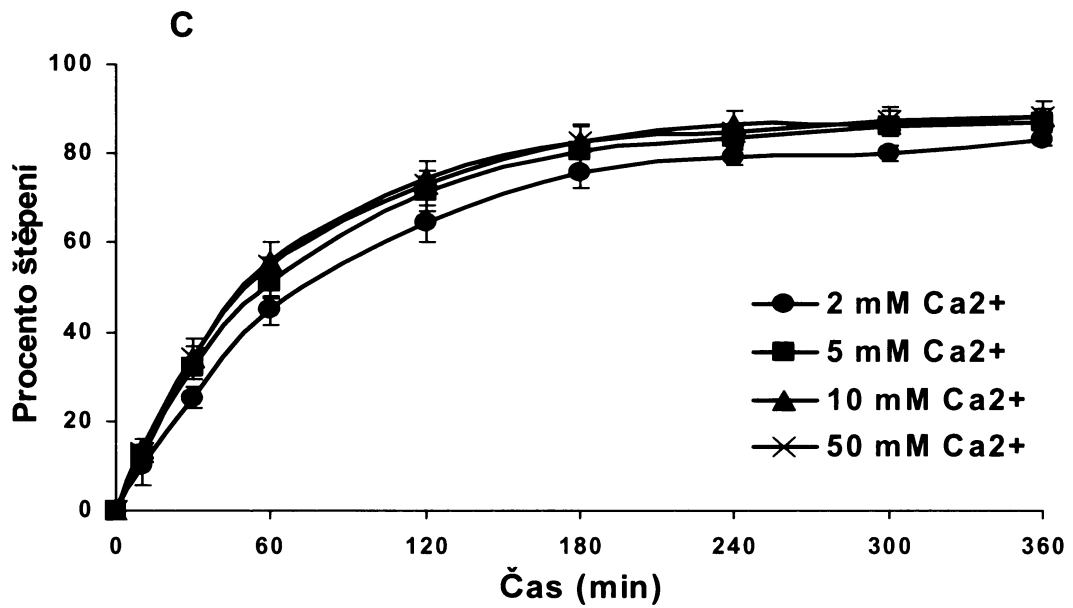
V dalším kroku byla u purifikovaných fúzních proteinů GST-SPM-C-His a MalE-SPM-CBD hledána optimální koncentrace vápenatých iontů pro jejich SPM-

zprostředkované štěpení. Štěpení bylo prováděno při 25 °C (pokojová teplota) nebo při 4 °C, dvou teplotách nejčastěji využívaných k purifikaci proteinů.

K tomuto účelu byly purifikované fúzní proteiny GST-SPM-C-His a MalE-SPM-CBD preinkubovány při 25 nebo 4 °C a SPM-zprostředkované štěpení vazby Asp<sup>414</sup>/Pro<sup>415</sup> bylo indukováno přidavkem vápenatých iontů o výsledné koncentraci 2, 5, 10 nebo 50 mmol/l. V časech 0, 60, 120, 180, 240, 300 a 360 minut při 25 °C a časech 0, 240, 480, 720, 960 a 1200 minut při 4 °C byly odebírány alikvoty, v nichž byla štěpící reakce zastavena přidavkem vzorkového pufru pro SDS-PAGE s 50 mM EDTA a produkty štěpení byly analyzovány postupem popsaným výše.

Jak je souhrnně ukázáno na Obr. 28, už nejnižší testovaná koncentrace vápenatých iontů (2 mM) efektivně indukovala štěpení obou fúzních proteinů a její další zvyšování až na koncentraci 10 mM mělo na zvyšování rychlosti štěpení jen slabý vliv (ke zvýšení nedošlo o více než 20 %). Rychlost štěpení indukovaná vápenatými ionty o koncentraci 50 mM byla podobná nebo dokonce nižší, než rychlost štěpení v přítomnosti 10 mM koncentrace vápenatých iontů, a proto 10 mM koncentrace Ca<sup>2+</sup> byla používána ve všech dalších experimentech. Při pokojové teplotě bylo štěpení obou fúzních proteinů stále velmi efektivní a více než 80 % GST-SPM-C-His a MalE-SPM-CBD bylo rozštěpeno během čtyř hodin (Obr. 28A a C). Při 4 °C byla dle očekávání rychlost štěpení významně snížena a té samé účinnosti štěpení GST-SPM-C-His jako při pokojové teplotě bylo při 4 °C dosaženo až po osmi hodinách (Obr. 28B), přičemž MalE-SPM-CBD byl za stejný čas štěpen pouze ze 60 % (Obr. 28D). Jeho další inkubace s 10 mM Ca<sup>2+</sup> vedla po 20 hodinách až k 75% konverzi (Obr. 28D).





Obr. 28: Časová závislost štěpení fúzních proteinů GST-SPM-C-His a MalE-SPM-CBD indukovaného různými koncentracemi vápenatých iontů při dvou různých teplotách. Purifikované fúzní proteiny GST-SPM-C-His (A, B) a MalE-SPM-CBD (C, D) byly štěpeny při 25 °C (A, C) nebo při 4 °C (B, D) v přítomnosti indikovaných koncentrací vápenatých iontů a v indikovaných časech byly odebírány alikvoty, v nichž byla štěpící reakce zastavena přidávkem vzorkového pufru pro SDS-PAGE s 50 mM EDTA. Produkty

štěpení byly děleny pomocí 10% SDS-PAGE a po barvení gelů Coomassie Blue kvantifikovány pomocí densitometrické analýzy. Získaná data byla statisticky vyhodnocena a kinetiky štěpení jsou vyneseny v grafech, v nichž byl každý bod získán ze čtyř různých stanovení a je prezentován jako průměrná hodnota  $\pm$  standardní odchylka.

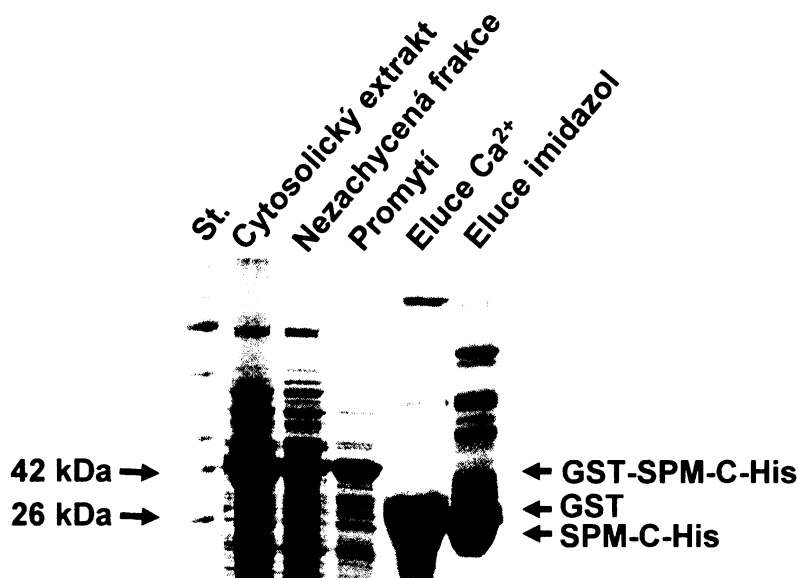
Všechna získaná data ukazují, že SPM odvozený od proteinu FrpC může být kombinován s různými rekombinantními proteiny a afinitními kotvami, aniž by došlo ke ztrátě jeho schopnosti efektivně a specificky štěpit vzniklé fúzní proteiny.

#### **5.2.4 SPM-zprostředkované štěpení fúzních proteinů po jejich vazbě na afinitní matrici**

K ověření, zda k účinnému štěpení fúzních proteinů GST-SPM-C-His a MalE-SPM-CBD bude docházet i po jejich vazbě na afinitní matrici byl cytosolický extrakt (kap. 5.2.2) obsahující GST-SPM-C-His nanesen na kolonu s Ni-NTA agarosou (kap. 4.2.13.3) a cytosolický extrakt (kap. 5.2.2) s MalE-SPM-CBD na chitinovou kolonu (kap. 4.2.13.5). Po odmytí všech kontaminujících proteinů bylo SPM-zprostředkované štěpení obou fúzních proteinů indukováno přidávkem pufru s vápenatými ionty o výsledné koncentraci 10 mM, která byla v předchozích experimentech stanovena jako optimální (kap. 5.2.3). Po ekvilibraci kolony tímto pufrem byla kolona uzavřena a ponechána při pokojové teplotě po dobu 6 hodin, za níž by mělo dojít k 80% konverzi obou fúzních proteinů (kap. 5.2.3). Po této době byl jímán odštěpený rekombinantní protein a po jeho kompletní eluci byl z kolony eluován zbývající fúzní partner, popřípadě neštěpený fúzní protein. V případě Ni-NTA agarosy byla z kolony eluována pomocí 250 mM imidazolu samoštěpitelná afinitní kotva SPM-C-His, resp. neštěpený GST-SPM-C-His, v případě chitinové matrice pak pomocí 2% SDS kotva SPM-CBD, resp. MalE-SPM-CBD.

Obr. 29 ukazuje, že na Ni-NTA matrici nebyl fúzní protein GST-SPM-C-His zachycen kompletně, ale i přesto u zachyceného fúzního proteinu docházelo k účinnému vyštěpení proteinu GST. Eluce samoštěpitelné afinitní kotvy SPM-C-His a neštěpeného GST-SPM-C-His pomocí 250 mM imidazolu pak ukázala, že byl fúzní protein štěpen téměř kompletně. Vzhledem k tomu, že je velikost GST (26,4 kDa) a

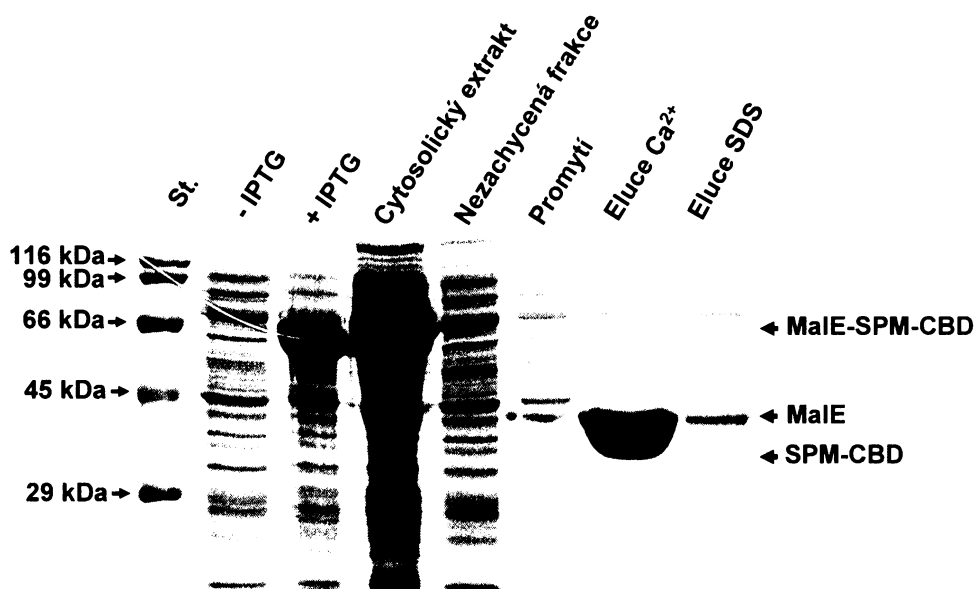
SPM-C-His (26,6 kDa) téměř identická a jejich identifikace na základě jejich velikosti pomocí SDS-PAGE je nejednoznačná, byly jim odpovídající proteinové proužky ve frakcích “Eluce Ca<sup>2+</sup>“ a “Eluce imidazol“ vyříznuty z gelu (Obr. 29) a identifikovány pomocí hmotové spektrometrie (kap. 4.2.14). Ta potvrdila téměř výhradní zastoupení proteinu GST v proužku izolovaném z frakce “Eluce Ca<sup>2+</sup>“ a proteinu SPM-C-His v proužku izolovaném z frakce “Eluce imidazol“.



Obr. 29: **Elektroforetická analýza jednotlivých frakcí purifikace rekombinantního proteinu GST na Ni-NTA agarose pomocí samoštěpitelné afinitní kotvy SPM-C-His.** Na kolonu s Ni-NTA agarosou byl nanesen cytosolický extrakt obsahující fúzní protein GST-SPM-C-His a po odmytí kontaminujících proteinů bylo indukováno jeho SPM-zprostředkované štěpení pomocí pufru s 10 mM Ca<sup>2+</sup>. Po ekvilibraci kolony tímto pufrem byla kolona uzavřena a ponechána při pokojové teplotě po dobu 6 hodin a poté byl jímán odštěpený GST. Nakonec byla z kolony eluována pomocí 250 mM imidazolu samoštěpitelná afinitní kotva SPM-C-His a neštěpený GST-SPM-C-His. Alikvoty proteinu po všech purifikačních krocích byly děleny pomocí 10% SDS-PAGE a gel byl barven Coomassie Blue. (St.) standard molekulových hmotností.

Protein MalE-SPM-CBD byl po aplikaci cytosolického extraktu na chitinové partikule zachycen téměř kompletně a po indukci SPM-zprostředkovaného štěpení vápenatými ionty z něj byl vyštěpován protein MalE (Obr. 30). K eluci samoštěpitelné

afinitní kotvy SPM-CBD a neštěpeného Male-SPM-CBD pomocí 2% SDS nedocházelo a je proto možné předpokládat, že jak SPM-CBD, tak Male-SPM-CBD se přes CBD vážou k chitinu s takovou afinitou, že nedochází k jejich eluci ani v přítomnosti 2% SDS, který donedávna výrobce chitinové matrice doporučoval pro její regeneraci (v současné době je pro regeneraci doporučován 0,3 M NaOH).



Obr. 30: **Elektroforetická analýza jednotlivých frakcí purifikace rekombinantního proteinu Male na chitinu pomocí samoštěpitelné afinitní kotvy SPM-CBD.** Na kolonu s chitinem byl nanesen cytosolický extrakt obsahující fúzní protein Male-SPM-CBD a po odmytí kontaminujících proteinů bylo indukováno jeho SPM-zprostředkované štěpení pomocí pufru s 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Po ekvilibraci kolony tímto pufrem byla kolona uzavřena a ponechána při pokojové teplotě po dobu 6 hodin a poté byl jímán odštěpený Male. Nakonec byla z kolony eluována pomocí 250 mM imidazolu samoštěpitelná afinitní kotva SPM-CBD a neštěpený Male-SPM-CBD. Alikvoty proteinu po všech purifikačních krocích byly děleny pomocí 10% SDS-PAGE a gel byl barven Coomassie Blue. (St.) standard molekulových hmotností.

Tyto výsledky ukazují, že SPM je schopen specificky a účinně vyštěpovat rekombinantní protein určený k purifikaci i po navázání výchozího fúzního proteinu k afinitní matici.



### 5.2.5 Ověření zachování enzymatických aktivit rekombinantních proteinů purifikovaných chromatografií založenou na samoštěpitelné SPM-CBD afinitní kotvě

Pro mnohé aplikace je nezbytně nutné, aby biochemické či biologické aktivity purifikovaných proteinů zůstaly po všech provedených chromatografických krocích nezměněny. Tak tomu může být například u purifikací enzymaticky aktivních proteinů. V rámci zavádění nového purifikačního systému založeného na SPM proteinu FrpC bylo proto testováno, zda u enzymů purifikovaných pomocí tohoto systému zůstane zachována jejich enzymatická aktivita. K tomuto účelu byly vybrány dva dobře charakterizované enzymaticky aktivní proteiny,  $\beta$ -galaktosidasa (LacZ) a chloramfenikol acetyltransferasa (CAT), u nichž je navíc stanovení jejich enzymatické aktivity velmi snadno a reprodukovatelně proveditelné. Bylo provedeno porovnání hodnot specifických aktivit těchto enzymů získaných po vyštěpení z fúze s SPM-CBD s hodnotami specifických aktivit příslušných volných enzymů. K tomu bylo využito plasmidů pro expresi LacZ-C-His a N-His-CAT fúzovaných s SPM-CBD (pTYB2-N-His-*cat*-SPM-CBD, pTYB2-*lacZ*-C-His-SPM-CBD) a plasmidů pro expresi volných LacZ-C-His a N-His-CAT (pTYB2-N-His-*cat*, pTYB2-*lacZ*-C-His), které byly zkonstruovány postupem popsáným v kap. 5.2.1.2, a z nichž byly připraveny cytosolické extrakty, jak je popsáno v kap. 5.2.2.

Proteiny LacZ-C-His a N-His-CAT byly z fúzních proteinů LacZ-C-His-SPM-CBD a N-His-CAT-SPM-CBD získány purifikací založené na samoštěpitelné afinitní kotvě SPM-CBD po SPM-zprostředkovaném štěpení postupem popsáným v předchozí kapitole (kap. 5.2.4) a vyštěpené proteiny LacZ-C-His a N-His-CAT byly následně převedeny do příslušných pufrů používaných ke stanovení enzymatických aktivit na Sephadexu G-25 (kap. 4.2.13.8).

Pro purifikaci volných LacZ-C-His a N-His-CAT proteinů byla použita chromatografie na Ni-NTA agarose (kap. 4.2.13.3), z které byly po odmytí kontaminujících proteinů eluovány LacZ-C-His, resp. N-His-CAT pomocí pufru obsahujícího imidazol o výsledné koncentraci 250 mmol/l. Oba proteiny byly následně

převezeny do příslušných pufrů používaných ke stanovení enzymatických aktivit na Sephadexu G-25 (kap. 4.2.13.8).

U všech čtyř takto purifikovaných proteinů byly stanoveny jejich enzymatické aktivity (kap. 4.2.17, 4.2.18), přičemž jednotlivá stanovení byla opakována celkem třikrát a výsledky statisticky vyhodnoceny. Získané hodnoty jsou uvedeny v Tab. 4 a ukazují, že specifické aktivity proteinů LacZ-C-His a N-His-CAT purifikovaných pomocí systému založeného na samoštěpitelné afinitní kotvě SPM-CBD jsou zcela srovnatelné se specifickými aktivitami proteinů LacZ-C-His a N-His-CAT purifikovaných ve volné formě na Ni-NTA agarose.

**Tab. 4: Srovnání hodnot specifických enzymatických aktivit purifikovaných volných proteinů LacZ-C-His a N-His-CAT s hodnotami specifických aktivit proteinů LacZ-C-His a N-His-CAT purifikovaných systémem založeným na samoštěpitelné afinitní kotvě SPM-CBD.**

Protein	Specifická aktivita [U/mg]	
	Chromatografie založená na SPM-CBD	Konvenční chromatografie (kontrolní proteiny)
LacZ-C-His	1596 ± 23	1606 ± 11
N-His-CAT	278 ± 19	290 ± 15

### **5.2.6 Porovnání účinnosti purifikačního systému založeného na SPM s komerčním systémem založeným na inteinu *S. cerevisiae***

Aby bylo možné konstatovat, že nově zaváděný purifikační systém založený na SPM proteinu FrpC může být použit jako plnohodnotná alternativa ke komerčně dostupnému systému založenému na inteinu (kap. 2.2.4), byly mezi sebou porovnávány výsledky získané purifikací stejného rekombinantního proteinu v obou zmíněných systémech. Jako rekombinantní protein byla použita katalyticky aktivní adenylátcyklasa (AC) izolovaná z ACT bakterie *B. pertussis*, u které je možné snadné, rychlé a přesné stanovení její enzymatické aktivity, což umožní celý purifikační proces monitorovat a vyhodnotit. Protože komerčně dostupný inteinový systém využívá jako afinitní kotvy CBD, byla tato kotva použita i v případě SPM.

Pro tento účel byly zkonstruovány plasmidy (kap. 5.2.1.3) pro expresi fúzních proteinů AC-SPM-CBD a AC-int-CBD. U získaných cytosolických extraktů (kap. 5.2.2) obsahujících tyto fúzní proteiny byla stanovena hodnota AC aktivity (kap. 4.2.19) a na jejím základě bylo množství AC-SPM-CBD a AC-int-CBD nastaveno ve výchozích extraktech na stejnou hodnotu, která byla vzata jako 100 % (Tab. 5). Poté byl každý z cytosolických extraktů nanesen na kolonu se stejným objemem chitinových partikulí, kontaminující proteiny byly odmyty (Tab. 5, nezachycená frakce a promytí) a štěpení fúzního proteinu bylo v případě AC-SPM-CBD indukováno přidavkem vápenatých iontů a v případě AC-int-CBD přidavkem dithiothreitolu (Tab. 5, indukce štěpení  $\text{Ca}^{2+}$ ). Po 16 hodinové inkubaci při 4 °C byl z obou kolon eluován AC protein (Tab. 5, eluce) (podrobný postup purifikací je popsán v kap. 4.2.13.4 a kap. 4.2.13.5). Jednotlivé frakce byly v průběhu purifikace jímány, analyzovány pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.20) a byla v nich stanovena enzymatická AC aktivita (kap. 4.2.19). Každá z purifikací byla opakována dvakrát a výsledné průměrné hodnoty AC aktivit v jednotlivých frakcích vztažené k původnímu cytosolickému extraktu (100 %) jsou uvedeny v Tab. 5. Poslední sloupec tabulky, reprezentující neštěpený AC-SPM-CBD, resp. AC-int-CBD, je prostým dopočtem do 100 %, protože AC aktivita nemohla být díky eluci 2% SDS v této frakci stanovena. Záporné číslo ve sloupci SPM-CBD je pak dáno chybou stanovení AC aktivity. Čistota AC domény po purifikaci v obou systémech je srovnána na Obr. 31.

Tab. 5: **Porovnání purifikačního systému založeného na SPM-CBD s komerčně dostupným systémem založeným na int-CBD.**

	<b>SPM-CBD</b>	<b>int-CBD</b>
<b>Cytosolický extrakt</b>	100 %	100 %
<b>Nezachycená frakce a promytí</b>	36 %	26 %
<b>Indukce štěpení <math>\text{Ca}^{2+}</math></b>	2 %	6 %
<b>Eluce</b>	<b>66 %</b>	<b>60 %</b>
<b>Neštěpený fúzní protein</b>	-4 %	8 %



Obr. 31: **Elektroforetická analýza exprese proteinů AC-SPM-CBD a AC-int-CBD a purifikace AC domény.** (1) cytosolický extrakt AC-SPM-CBD; (2) cytosolický extrakt AC-int-CBD; (3) AC doména po purifikaci pomocí systému založeného na samoštěpitelné afinitní kotvě SPM-CBD; (4) AC doména po purifikaci pomocí systému založeného na samoštěpitelné afinitní kotvě int-CBD. Vzorky byly děleny pomocí 7,5% SDS-PAGE a gel byl barven Coomassie Blue. (St.) standard molekulových hmotností.

Získané výsledky ukazují, že v této práci vyvinutý purifikační systém založený na SPM proteinu FrpC je plně srovnatelný se systémem založeným na modifikovaném inteinu, který je komerčně dostupný od firmy New England Biolabs.

## 6 Diskuse

### 6.1 Diskuse proteinu ACT

V první části této diplomové práce je pojednáno o využití proteinu ACT jako vektoru pro dopravu antigenů do APC a jejich následnou prezentaci prostřednictvím molekul MHC II. třídy. Bylo studováno, zda RTX hemolysinová část ACT je schopna dopravovat do APC celé proteiny, a ne pouze jejich jednotlivé epitopy. Jako modelový protein byl vybrán protein MalE (42 kDa) z *E. coli* K12, kterým byla v molekule ACT nahrazena AC doména a vznikl tak fúzní protein MalE-RTX. Zároveň bylo studováno, zda je k dopravě MalE prostřednictvím RTX hemolysinu do APC a následně k prezentaci na MHC II. třídy nezbytná hydrofobní doména toxinu nebo její část.

Molekula ACT je schopna se vázat k integrinovému receptoru CD11b/CD18 myeloidních buněk (74), přičemž vazba k tomuto receptoru je jednou z podmínek účinné dopravy zabudovaného epitopu do APC (120). Z výsledků kompetičních vazebných experimentů vyplývá (Obr. 22), že náhradou celé AC domény proteinu ACT proteinem MalE (MalE-RTX) nedochází v porovnání s původním detoxifikovaným ACT/E5 ke snížení schopnosti vazby tohoto fúzního proteinu na receptor CD11b/CD18. Vazebné schopnosti připravených variant proteinu MalE-RTX, nesoucích delece v oblasti hydrofobní domény RTX hemolysinu, závisí na typu provedené delece. Deleční varianta MalE-RTX $\Delta$ 374-647 se k CD11b/CD18 váže téměř se stejnou afinitou jako MalE-RTX, tedy i jako původní ACT/E5. Na druhé straně, deleční varianty MalE-RTX $\Delta$ 647-854 a MalE-RTX $\Delta$ 374-854 vykazují v porovnání s ACT/E5 sníženou schopnost vazby k integrinovému receptoru. Je tedy možné předpokládat, že k vazebným schopnostem ACT by kromě samotného vazebného místa pro integrinový receptor CD11b/CD18, nacházejícího se v oblasti aminokyselinových zbytků 1166-1281 repetitivní domény RTX hemolysinu, mohla přispívat také oblast hydrofobní domény mezi aminokyselinovými zbytky 647-854. Dalším možným vysvětlením je, že by delece v této oblasti mohla vést k takové změně konformace vazebného místa pro integrin, která by měla za následek snížení schopnosti vazby MalE-RTX $\Delta$ 647-854, resp. MalE-RTX $\Delta$ 374-854 k tomuto receptoru. Kontrolní volný MalE-C-His protein nevykazoval dle očekávání žádnou afinitu k integrinu CD11b/CD18. Již dříve bylo

ukázáno, že acylace proteinu ACT je nezbytná pro ireverzibilní vazbu toxinu na receptor CD11b/CD18 (74), a tedy podobně jako neacylovaná forma původního ACT taktéž ani neacylovaná forma proteinu MalE-RTX $\Delta$ CyaC, použitá jako další z kontrolních proteinů, nebyla schopna ireverzibilní vazby k integrinovému receptoru.

Při studiu schopnosti fúzního proteinu MalE-RTX a jeho jednotlivých delečních variant dopravovat protein MalE do APC pro následnou prezentaci jeho CD4<sup>+</sup> T-buněčného epitopu na molekulách MHC II. třídy bylo ukázáno (Obr. 23), že i přes substituci celé AC domény proteinem MalE (MalE-RTX) zůstává schopnost RTX hemolysinové části ACT dopravovat celý MalE antigen do APC zachována a následná prezentace CD4<sup>+</sup> T-buněčného epitopu odvozeného z MalE na molekulách MHC II. třídy je stejná jako by byl k prezentaci dopravován molekulou ACT pouze tento CD4<sup>+</sup> T-buněčný epitop samostatně. Ke srovnání bylo použito proteinu MalEp-OVAp-ACT/E5, který nesl zabudovaný MalE CD4<sup>+</sup> T-buněčný epitop v pozici 336 původního detoxifikovaného ACT a jeho konstrukce a použití byly popsány již dříve (85). Na druhé straně, žádná z delečních variant proteinu MalE-RTX nebyla schopna účinně dopravovat MalE epitop k prezentaci na molekulách MHC II. třídy. Je tedy pravděpodobné, že přestože u deleční varianty MalE-RTX $\Delta$ 374-647 je afinita k integrinovému receptoru dostatečná (srovnatelná s afinitou MalE-RTX a ACT/E5, viz výše) není tato schopna účinně dopravit MalE epitop do endocytické dráhy APC pro jeho následné zpracování a prezentaci prostřednictvím molekul MHC II. třídy. Obdobné výsledky byly získány u detoxifikované molekuly MalEp-OVAp-ACT/E5-E570K-E581P nesoucí v pozici 108 proteinu ACT vložený CD8<sup>+</sup> T-buněčný OVA epitop (SIINFEKL), v pozici 336 zde zmiňovaný MalE CD4<sup>+</sup> T-buněčný epitop a v oblasti hydrofobní domény bodové mutace nahrazující zbytek glutamátu v pozici 570 zbytkem lysinu a zbytek glutamátu v pozici 581 zbytkem prolinu. Také tato molekula se vážala na integrinový receptor CD11b/CD18 se stejnou afinitou jako původní ACT/E5, a přesto nebyla schopna účinně dopravovat MalE epitop k prezentaci na molekulách MHC II. třídy (R. Fišer, J. Mašín, nepublikovaná data). To naznačuje, že hydrofobní doména hraje důležitou roli při správné dopravě, zpracování a/nebo prezentaci epitopu. Na objasnění molekulárního mechanismu, který by vysvětloval proč molekuly s pozměněnou hydrofobní doménou nedokáží prezentovat na MHC molekulách II. třídy

CD4<sup>+</sup> T-buněčný epitop, přestože se účinně váží na integrinový receptor, se v současnosti pracuje.

Získané výsledky navíc ukazují, že kontrolní protein MalE-C-His byl schopen prezentace CD4<sup>+</sup> T-buněčného epitopu na molekulách MHC II. třídy se 100-násobně nižší účinností v porovnání s fúzí MalE-RTX. Obdobné výsledky byly prezentovány již dříve pro molekuly ACT nesoucí v různých pozicích toxinu zabudovaný pouze MalE epitop, které byly schopny jeho dopravy na molekuly MHC II. třídy s přibližně 100-násobně vyšší účinností, než když byl příslušný epitop použit ve formě volného peptidu (85).

Doposud byly publikovány výsledky týkající se úspěšné dopravy antigenů do APC pomocí ACT pro antigeny do velikosti 100 aminokyselinových zbytků (79, 121). Z výsledků získaných v této práci vyplývá, že kapacita ACT je v tomto ohledu ještě mnohem vyšší, a že je možné pomocí RTX hemolysinové části ACT účinně dopravovat do APC antigen o velikosti až 382 aminokyselinových zbytků. Toho by mohlo být v budoucnu využito při vakcinaci proti různým typům bakteriálních, virových i parazitárních onemocnění, kdy by do molekuly ACT byly jako náhrada za její AC doménu vkládány celé proteiny, proti jejichž různým epitopům by byla stimulována imunitní odpověď. Stejně tak by mělo být možné s RTX hemolysinovou částí ACT kombinovat několik CD4<sup>+</sup> T-buněčných epitopů odvozených z různých typů proteinů a stimulovat imunitní odpověď proti všem těmto epitopům najednou.

## 6.2 Diskuse proteinu FrpC

Druhá část této diplomové práce se zabývá konstrukcí nového typu samoštěpitelné afinitní kotvy založené na SPM proteinu FrpC a možnostmi jejího využití při purifikaci rozpustných rekombinantních proteinů. Myšlenka použití SPM k tvorbě purifikačního systému vznikla na základě nedávno publikovaných výsledků (112), které ukázaly, že SPM doména FrpC je schopna specificky štěpit tento protein mezi aminokyselinovými zbytky Asp<sup>414</sup>/Pro<sup>415</sup> po indukci vápenatými ionty.

Jako afinitní kotvy, fúzované k C-koncové části SPM, byly vybrány histidinová kotva (0,8 kDa) a CBD kotva (5,7 kDa), tedy kotvy rozdílné nejen co do velikosti každé z nich, ale také interagující s afinitní maticí na odlišném fyzikálně-

chemickém principu. Při volbě N-koncových fúzních partnerů SPM byl proveden v rámci možností co možná nejširší výběr velikostně i vlastnostmi odlišných rekombinantních proteinů, mezi které patřily maltosu-vázající protein, glutathion-S-transferasa, chloramfenikol acetyltransferasa,  $\beta$ -galaktosidasa a adenylátcyklasa. Afinitní kotvy i rekombinantní proteiny různého typu i různé velikosti byly vybrány proto, aby bylo možné ověřit, zda právě typ a velikost SPM fúzních partnerů nebudou mít negativní vliv na SPM-zprostředkované štěpení vzniklých fúzních proteinů. Ze získaných výsledků pro fúzní proteiny GST-SPM-C-His (53 kDa), GST-SPM-CBD (58 kDa) a MalE-SPM-CBD (74 kDa) lze shrnout (Obr. 27), že kinetika štěpení jednotlivých fúzních proteinů v roztoku byla na typu rekombinantního proteinu a/nebo afinitní kotvy a také velikosti jednotlivých fúzních partnerů závislá jen minimálně a navíc jejich štěpení probíhalo se stejnou či velmi podobnou účinností jako štěpení původního proteinu FrpC $\Delta$ RTX. U fúzních proteinů GST-SPM-C-His a MalE-SPM-CBD se projevil rozdíl v kinetice štěpení až při štěpení proteinů při teplotě 4 °C (Obr. 28). Tento rozdíl byl jen minimální, pokud bylo štěpení prováděno při pokojové teplotě (Obr. 28).

Pokud byly fúzní proteiny GST-SPM-C-His a MalE-SPM-CBD navázány na afinitní matici a pomocí vápenatých iontů bylo indukováno SPM-zprostředkované štěpení vazby Asp<sup>414</sup>/Pro<sup>415</sup>, docházelo opět k účinnému vyštěpování rekombinantních proteinů GST nebo MalE. V případě GST je možné konstatovat, že jeho vyštěpení na matici bylo stejně účinné, ne-li účinnější než v roztoku, protože po eluci samoštěpitelné afinitní kotvy SPM-C-His a neštěpeného GST-SPM-C-His pomocí 250 mM imidazolu byla pomocí SDS-PAGE téměř výhradně detekována afinitní kotva SPM-C-His (potvrzeno hmotovou spektrometrií) a jen minimum proteinu, který by na základě molekulové hmotnosti odpovídal neštěpené formě GST-SPM-C-His (Obr. 29). U proteinu MalE vyštěpeného z fúzního proteinu MalE-SPM-CBD nebylo možné účinnost štěpení odhadnout, protože k eluci samoštěpitelné afinitní kotvy SPM-CBD a neštěpeného MalE-SPM-CBD nedocházelo ani přidávkem 2% SDS (Obr. 30).

Pro ověření, zda u enzymaticky aktivních proteinů purifikovaných pomocí systému založeného na SPM proteinu FrpC zůstane zachována jejich enzymatická aktivita byly použity proteiny chloramfenikol acetyltransferasa a  $\beta$ -galaktosidasa. Tyto enzymy byly vybrány proto, že po jejich N- i C-koncové fúzi k příslušnému proteinu



dochází pouze k dočasnému snížení jejich aktivity, ale ne k takovým ireverzibilním změnám jejich konformace, které by měly za následek její úplnou ztrátu (122-124). Navíc je stanovení jejich specifické aktivity poměrně snadno a reprodukovatelně proveditelné. Při porovnání specifických aktivit purifikovaných volných forem N-His-CAT i LacZ-C-His s hodnotami získanými pro stejné proteiny po jejich vyštěpení z příslušných fúzních proteinů je zřejmé, že purifikačním postupem založeným na SPM-CBD nedochází u těchto proteinů ke ztrátě jejich enzymatické aktivity (Tab. 4).

Již dříve bylo pozorováno, že v důsledku SPM-zprostředkovaného štěpení molekuly FrpC dochází k tvorbě extrémně stabilních vysokomolekulových forem rekombinantního proteinu FrpC, jejichž detailní analýza pomocí hmotové spektrometrie ukázala, že se 45 kDa N-koncový fragment proteinu FrpC, vzniklý štěpením vazby Asp<sup>414</sup>/Pro<sup>415</sup>, může vázat přes C-terminální aspartátový zbytek k  $\epsilon$ -aminoskupině lysinového zbytku jiné molekuly FrpC a vytvářet tak kovalentní isopeptidovou vazbu (112). Účinnost tvorby těchto vysokomolekulových forem byla poměrně nízká a docházelo k ní přibližně u 10 % štěpených molekul FrpC. Nedávno bylo zjištěno, že tvorbu vysokomolekulových forem FrpC je možné kompletně inhibovat přidávkem činidel s -SH skupinou jako jsou DTT,  $\beta$ -merkptoethanol nebo cystein, aniž by docházelo k ovlivnění SPM-zprostředkovaného štěpení (R. Osička, nepublikovaná data). Tvorba podobných vysokomolekulových forem byla pozorována i v případě SPM-zprostředkovaného štěpení zde připravených fúzních proteinů (data neukázána). Aby se zabránilo tvorbě vysokomolekulových forem a zvýšil se tak výtěžek purifikovaných rekombinantních proteinů, bylo v této práci každé SPM-zprostředkované štěpení fúzního proteinu prováděno v přítomnosti pufru s 10 mM DTT, který je dostačující pro kompletní inhibici tvorby vysokomolekulových forem.

V závěru práce byl nově zaváděný purifikační systém založený na SPM proteinu FrpC srovnáván s komerčně dostupným systémem založeným na modifikovaném inteinu (New England Biolabs). Získané výsledky ukázaly (Tab. 5), že pomocí purifikačního systému založeného na SPM proteinu FrpC je možné purifikovat stejná množství rekombinantního AC proteinu jako pomocí systému založeného na inteinu. Vzhledem k tomu, že oba systémy využívaly stejné afinitní kotvy (CBD), byla čistota purifikovaného rekombinantního proteinu získaného pomocí obou systémů velmi podobná (Obr. 31).

Všechny výše popsané výsledky ukazují, že zde vyvinutý purifikační systém založený na SPM proteinu FrpC bakterie *N. meningitidis* je plně funkční a může ho být s úspěchem využito jako plnohodnotné alternativy systému komerčního.

# 7 Závěr

## 7.1 Závěr studia proteinu ACT

1. Byl zaveden nový systém pro expresi rekombinantního ACT a jeho derivátů v buňkách *E. coli* BL21 nesoucích plasmid pMM100. Byly provedeny produkce rekombinantního ACT z obou systémů a výsledná množství proteinu byla densitometricky kvantifikována. Ze získaných hodnot je možné uzavřít, že množství rekombinantního ACT, která lze produkovat v novém systému jsou až 3-krát vyšší než v systému stávajícím.
2. K zodpovězení otázky, zda je RTX hemolysinová část ACT schopna dopravovat do APC celý modelový protein MalE (42 kDa), a ne pouze jeho přesně definovaný CD4<sup>+</sup> T-buněčný epitop (NGKLIAYPIAVEALS), jak bylo ukázáno dříve, a dále k objasnění role hydrofobní domény ACT v dopravě MalE do APC pro následnou prezentaci na MHC glykoproteinech II. třídy, byly zkonstruovány plasmidy umožňující produkci fúzního proteinu MalE-RTX, jeho delečních variant v hydrofobní doméně a kontrolních proteinů MalE-C-His a ACT/E5.
3. Příslušné proteiny byly produkovány, purifikovány a testovány na množství přítomného lipopolysacharidu. Následně byly v laboratoři Prof. C. Leclerc (Pasteurův ústav, Paříž) použity k imunologickým studiím.
4. S uvedenými proteiny byly provedeny kompetiční vazebné experimenty, které ukázaly, že fúzní protein MalE-RTX má stejné vazebné schopnosti jako původní nepozměněný protein, ACT/E5. Stejně tak jeho deleční varianta MalE-RTX $\Delta$ 374-647 se váže na integrin CD11b/CD18 se stejnou afinitou jako původní ACT/E5. Další dvě deleční varianty, MalE-RTX $\Delta$ 647-854 a MalE-RTX $\Delta$ 374-854, však již vykazovaly sníženou schopnost vazby a kontrolní volný protein MalE-C-His nebyl schopen vazby na integrinový receptor vůbec. Tyto výsledky ukázaly, že k vazbě ACT na molekulu integrinu je důležitá oblast RTX hemolysinu mezi zbytky 647-854.

5. I přes substituci celé AC domény proteinem MalE (MalE-RTX) zůstala schopnost RTX hemolysinové části ACT dopravovat celý MalE protein do APC zachována a následná prezentace CD4<sup>+</sup> T-buněčného epitopu odvozeného z MalE na molekulách MHC II. třídy byla stejná jako by byl k prezentaci dopravován molekulou ACT pouze tento CD4<sup>+</sup> T-buněčný epitop samostatně. Na druhé straně, žádná z delečních variant proteinu MalE-RTX nebyla schopna dopravovat MalE k prezentaci prostřednictvím MHC II. třídy. Kontrolní protein MalE-C-His byl schopen prezentace CD4<sup>+</sup> T-buněčného epitopu se 100-násobně nižší účinností, než fúze MalE-RTX a kontrolní protein ACT/E5 byl na úrovni pozadí experimentu.

## 7.2 Závěry studia proteinu FrpC

1. Byly zkonstruovány plasmidy umožňující produkci rekombinantních proteinů fúzovaných se samoštěpitelnou SPM doménou proteinu FrpC a afinitní kotvou (CBD, C-His), které byly použity k charakterizaci vlastností nového systému určeného pro purifikaci rozpustných rekombinantních proteinů.
2. Příslušné fúzní proteiny byly produkovány, purifikovány a bylo ověřeno, že u nich dochází k velmi účinnému a specifickému SPM-zprostředkovanému vyštěpení rekombinantního proteinu.
3. Bylo zjištěno, že štěpení probíhá u fúzních proteinů v roztoku nejefektivněji pokud je indukce štěpení provedena přidavkem vápenatých iontů o výsledné koncentraci 10 mmol/l. K efektivnímu štěpení docházelo nejen při pokojové teplotě, ale i při 4 °C.
4. K účinnému a specifickému vyštěpení rekombinantního proteinu docházelo i v případech, kdy příslušné fúzní proteiny byly vázány na afinitní matici. Rekombinantní protein pak mohl být po odmytí kontaminujících proteinů z kolony a vyštěpení z fúze eluován z kolony jako čistý protein, přičemž samoštěpitelná afinitní kotva (SPM-CBD, SPM-C-His) zůstala navázána na matici.
5. Purifikační systém fungoval pro každý z testovaných proteinů (GST, MalE, CAT, LacZ, AC) a též pro obě afinitní kotvy (CBD, C-His), a to i přes skutečnost, že

jednotlivé proteiny jsou vlastnostmi i velikostně značně rozdílné a též vlastnosti jednotlivých druhů afinitních matric se výrazně liší.

6. Bylo provedeno porovnání hodnot specifických aktivit enzymaticky aktivních proteinů ( $\beta$ -galaktosidasa, chloramfenikol acetyltransferasa) získaných po vyštěpení z fúze s SPM-CBD s hodnotami specifických aktivit těchto enzymů purifikovaných jako volné proteiny. Z výsledků měření specifických aktivit lze shrnout, že aktivita enzymaticky aktivních proteinů zůstává po purifikaci založené na SPM-CBD samoštěpitelné afinitní kotvě nezměněna.
7. Bylo provedeno srovnání účinnosti purifikačního systému založeného na SPM proteinu FrpC s komerčním systémem založeným na modifikovaném inteinu kvasinky *S. cerevisiae*. Dosažené výsledky ukazují, že purifikační systém založený na SPM proteinu FrpC bakterie *N. meningitidis* může být použit pro purifikaci rozpustných rekombinantních proteinů jako plnohodnotná alternativa systému komerčního.

## 8 Seznam použité literatury

1. Welch, R.A., Bauer, M.E., Kent, A.D., Leeds, J.A., Moayeri, M., Regassa, L.B. and Swenson, D.L., (1995), *Infect Agents Dis.* **4**, 254-272.
2. Lally, E.T., Hill, R.B., Kieba, I.R. and Korostoff, J., (1999), *Trends Microbiol.* **7**, 356-361.
3. Kuhnert, P., Heyberger-Meyer, B., Burnens, A.P., Nicolet, J. and Frey, J., (1997), *Appl Environ Microbiol.* **63**, 2258-2265.
4. Jansen, R., Briaire, J., Kamp, E.M., Gielkens, A.L. and Smits, M.A., (1993), *Infect Immun.* **61**, 3688-3695.
5. Forestier, C. and Welch, R.A., (1991), *Infect Immun.* **59**, 4212-4220.
6. Fullner, K.J., Boucher, J.C., Hanes, M.A., Haines, G.K., 3rd, Meehan, B.M., Walchle, C., Sansonetti, P.J. and Mekalanos, J.J., (2002), *J Exp Med.* **195**, 1455-1462.
7. Glaser, P., Ladant, D., Sezer, O., Pichot, F., Ullmann, A. and Danchin, A., (1988), *Mol Microbiol.* **2**, 19-30.
8. Bordet, J., Gengou, O., (1906), *Ann.Inst.Pasteur.* **20**.
9. Fine, P.E. and Clarkson, J.A., (1987), *Rev Infect Dis.* **9**, 866-883.
10. Sato, Y., Kimura, M. and Fukumi, H., (1984), *Lancet.* **1**, 122-126.
11. Edwards, K.M., (1993), *J Infect Dis.* **168**, 15-20.
12. Cherry, J.D., (1997), *Dev Biol Stand.* **89**, 181-186.
13. W. H. Organization, T.W.H.R., 1999: Making a Difference" (World Health Organization, 1999), (1999).
14. Preston, N.W., Wardlaw, A. C., Parton, R., (1988), John Wiley, London.
15. Mims, C.A., Playfair, J., Roitt, I. M., Wakelin, D., Williams R., (1993), *Medical Microbiology* (Mosty-Year Book Europe Limited, Hong-Kong).
16. Locht, C., (1999), *Int Microbiol.* **2**, 137-144.
17. Kerr, J.R. and Matthews, R.C., (2000), *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **19**, 77-88.
18. Heininger, U., (2001), *Curr Opin Infect Dis.* **14**, 329-335.
19. Smith, A.M., Guzman, C.A. and Walker, M.J., (2001), *FEMS Microbiol Rev.* **25**, 309-333.

20. Weiss, J., Hewlett, E.L. and Cronin, M.J., (1986), *Biochem Biophys Res Commun.* **136**, 463-469.
21. Heiss, L.N., Flak, T.A., Lancaster, J.R., Jr., McDaniel, M.L. and Goldman, W.E., (1993), *Infect Agents Dis.* **2**, 173-177.
22. Flak, T.A. and Goldman, W.E., (1996), *Am J Respir Crit Care Med.* **154**, S202-206.
23. Tamura, M., Nogimori, K., Murai, S., Yajima, M., Ito, K., Katada, T., Ui, M. and Ishii, S., (1982), *Biochemistry.* **21**, 5516-5522.
24. Tamura, M., Nogimori, K., Yajima, M., Ase, K. and Ui, M., (1983), *J Biol Chem.* **258**, 6756-6761.
25. Livey, I. and Wardlaw, A.C., (1984), *J Med Microbiol.* **17**, 91-103.
26. Zhang, Y.L. and Sekura, R.D., (1991), *Infect Immun.* **59**, 3754-3759.
27. Horiguchi, Y., Inoue, N., Masuda, M., Kashimoto, T., Katahira, J., Sugimoto, N. and Matsuda, M., (1997), *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**, 11623-11626.
28. Masuda, M., Betancourt, L., Matsuzawa, T., Kashimoto, T., Takao, T., Shimonishi, Y. and Horiguchi, Y., (2000), *Embo J.* **19**, 521-530.
29. Schmidt, G., Goehring, U.M., Schirmer, J., Uttenweiler-Joseph, S., Wilm, M., Lohmann, M., Giese, A., Schmalzing, G. and Aktories, K., (2001), *Infect Immun.* **69**, 7663-7670.
30. Weiss, A.A. and Falkow, S., (1984), *Infect Immun.* **43**, 263-269.
31. Gross, R., Carbonetti, N.H., Rossi, R. and Rappuoli, R., (1992), *Res Microbiol.* **143**, 671-681.
32. Khelef, N., Sakamoto, H. and Guiso, N., (1992), *Microb Pathog.* **12**, 227-235.
33. Weiss, A.A., Hewlett, E.L., Myers, G.A. and Falkow, S., (1984), *J Infect Dis.* **150**, 219-222.
34. Glaser, P., Danchin, A., Ladant, D., Barzu, O. and Ullmann, A., (1988), *Tokai J Exp Clin Med.* **13 Suppl**, 239-252.
35. Barry, E.M., Weiss, A.A., Ehrmann, I.E., Gray, M.C., Hewlett, E.L. and Goodwin, M.S., (1991), *J Bacteriol.* **173**, 720-726.
36. Laoide, B.M. and Ullmann, A., (1990), *Embo J.* **9**, 999-1005.
37. Arico, B., Miller, J.F., Roy, C., Stibitz, S., Monack, D., Falkow, S., Gross, R. and Rappuoli, R., (1989), *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**, 6671-6675.

38. Akerley, B.J. and Miller, J.F., (1996), *Trends Microbiol.* **4**, 141-146.
39. Uhl, M.A. and Miller, J.F., (1994), *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**, 1163-1167.
40. Roy, C.R. and Falkow, S., (1991), *J Bacteriol.* **173**, 2385-2392.
41. Marques, R.R. and Carbonetti, N.H., (1997), *Mol Microbiol.* **24**, 1215-1224.
42. Karimova, G., Bellalou, J. and Ullmann, A., (1996), *Mol Microbiol.* **20**, 489-496.
43. Hewlett, E.L., Gordon, V.M., McCaffery, J.D., Sutherland, W.M. and Gray, M.C., (1989), *J Biol Chem.* **264**, 19379-19384.
44. Sakamoto, H., Bellalou, J., Sebo, P. and Ladant, D., (1992), *J Biol Chem.* **267**, 13598-13602.
45. Confer, D.L. and Eaton, J.W., (1982), *Science.* **217**, 948-950.
46. Hanski, E., (1989), *Trends Biochem Sci.* **14**, 459-463.
47. Ladant, D., (1988), *J Biol Chem.* **263**, 2612-2618.
48. Ladant, D., Michelson, S., Sarfati, R., Gilles, A.M., Predeleanu, R. and Barzu, O., (1989), *J Biol Chem.* **264**, 4015-4020.
49. Munier, H., Gilles, A.M., Glaser, P., Krin, E., Danchin, A., Sarfati, R. and Barzu, O., (1991), *Eur J Biochem.* **196**, 469-474.
50. Glaser, P., Elmaoglou-Lazaridou, A., Krin, E., Ladant, D., Barzu, O. and Danchin, A., (1989), *Embo J.* **8**, 967-972.
51. Glaser, P., Munier, H., Gilles, A.M., Krin, E., Porumb, T., Barzu, O., Sarfati, R., Pellecuer, C. and Danchin, A., (1991), *Embo J.* **10**, 1683-1688.
52. Guo, Q., Shen, Y., Lee, Y.S., Gibbs, C.S., Mrksich, M. and Tang, W.J., (2005), *Embo J.* **24**, 3190-3201.
53. Welch, R.A., (1991), *Mol Microbiol.* **5**, 521-528.
54. Coote, J.G., (1992), *FEMS Microbiol Rev.* **8**, 137-161.
55. Welch, R.A., (2001), *Curr Top Microbiol Immunol.* **257**, 85-111.
56. Benz, R., Maier, E., Ladant, D., Ullmann, A. and Sebo, P., (1994), *J Biol Chem.* **269**, 27231-27239.
57. Szabo, G., Gray, M.C. and Hewlett, E.L., (1994), *J Biol Chem.* **269**, 22496-22499.
58. Bellalou, J., Sakamoto, H., Ladant, D., Geoffroy, C. and Ullmann, A., (1990), *Infect Immun.* **58**, 3242-3247.
59. Mock, M. and Ullmann, A., (1993), *Trends Microbiol.* **1**, 187-192.



60. Westrop, G.D., Hormozi, E.K., Da Costa, N.A., Parton, R. and Coote, J.G., (1996), *Gene*. **180**, 91-99.
61. Hackett, M., Guo, L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and Hewlett, E.L., (1994), *Science*. **266**, 433-435.
62. Havlicek, V., Higgins, L., Chen, W., Halada, P., Sebo, P., Sakamoto, H. and Hackett, M., (2001), *J Mass Spectrom*. **36**, 384-391.
63. Basar, T., Havlicek, V., Bezouskova, S., Halada, P., Hackett, M. and Sebo, P., (1999), *J Biol Chem*. **274**, 10777-10783.
64. Rose, T., Sebo, P., Bellalou, J. and Ladant, D., (1995), *J Biol Chem*. **270**, 26370-26376.
65. Rhodes, C.R., Gray, M.C., Watson, J.M., Muratore, T.L., Kim, S.B., Hewlett, E.L. and Grisham, C.M., (2001), *Arch Biochem Biophys*. **395**, 169-176.
66. Ludwig, A., Tengler, C., Bauer, S., Bubert, A., Benz, R., Mollenkopf, H.J. and Goebel, W., (1995), *Mol Gen Genet*. **249**, 474-486.
67. Gentschev, I., Dietrich, G. and Goebel, W., (2002), *Trends Microbiol*. **10**, 39-45.
68. Hanski, E. and Farfel, Z., (1985), *J Biol Chem*. **260**, 5526-5532.
69. Hewlett, E.L., Gray, L., Allietta, M., Ehrmann, I., Gordon, V.M. and Gray, M.C., (1991), *J Biol Chem*. **266**, 17503-17508.
70. Iwaki, M., Ullmann, A. and Sebo, P., (1995), *Mol Microbiol*. **17**, 1015-1024.
71. Osickova, A., Osicka, R., Maier, E., Benz, R. and Sebo, P., (1999), *J Biol Chem*. **274**, 37644-37650.
72. Guermonprez, P., Khelef, N., Blouin, E., Rieu, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Guiso, N., Ladant, D. and Leclerc, C., (2001), *J Exp Med*. **193**, 1035-1044.
73. Khelef, N., Gounon, P. and Guiso, N., (2001), *Cell Microbiol*. **3**, 721-730.
74. El-Azami-El-Idrissi, M., Bauche, C., Loucka, J., Osicka, R., Sebo, P., Ladant, D. and Leclerc, C., (2003), *J Biol Chem*. **278**, 38514-38521.
75. Janeway, C.A., Jr., (2001), *Microbes Infect*. **3**, 1167-1171.
76. Hiltbold, E.M. and Roche, P.A., (2002), *Curr Opin Immunol*. **14**, 30-35.
77. Hudson, A.W. and Ploegh, H.L., (2002), *Exp Cell Res*. **272**, 1-7.
78. Koch, J., Guntrum, R. and Tampe, R., (2005), *FEBS Lett*. **579**, 4413-4416.

79. Majlessi, L., Simsova, M., Jarvis, Z., Brodin, P., Rojas, M.J., Bauche, C., Nouze, C., Ladant, D., Cole, S.T., Sebo, P., and Leclerc, C., (2006), *Infect Immun.* **74**, 2128-2137.
80. Ladant, D., Glaser, P. and Ullmann, A., (1992), *J Biol Chem.* **267**, 2244-2250.
81. Sebo, P., Fayolle, C., d'Andria, O., Ladant, D., Leclerc, C. and Ullmann, A., (1995), *Infect Immun.* **63**, 3851-3857.
82. Fayolle, C., Sebo, P., Ladant, D., Ullmann, A. and Leclerc, C., (1996), *J Immunol.* **156**, 4697-4706.
83. Fayolle, C., Ladant, D., Karimova, G., Ullmann, A. and Leclerc, C., (1999), *J Immunol.* **162**, 4157-4162.
84. Fayolle, C., Osickova, A., Osicka, R., Henry, T., Rojas, M.J., Saron, M.F., Sebo, P. and Leclerc, C., (2001), *J Virol.* **75**, 7330-7338.
85. Loucka, J., Schlecht, G., Vodolanova, J., Leclerc, C. and Sebo, P., (2002), *Infect Immun.* **70**, 1002-1005.
86. Simsova, M., Sebo, P. and Leclerc, C., (2004), *Int J Med Microbiol.* **293**, 571-576.
87. Mackova, J., Stasikova, J., Kutinova, L., Masin, J., Hainz, P., Simsova, M., Gabriel, P., Sebo, P. and Nemeckova, S., (2006), *Cancer Immunol Immunother.* **55**, 39-46.
88. Dadaglio, G., Morel, S., Bauche, C., Moukrim, Z., Lemonnier, F.A., Van Den Eynde, B.J., Ladant, D. and Leclerc, C., (2003), *Int Immunol.* **15**, 1423-1430.
89. Brodin, P., Majlessi, L., Marsollier, L., de Jonge, M.I., Bottai, D., Demangel, C., Hinds, J., Neyrolles, O., Butcher, P.D., Leclerc, C., Cole, S.T., and Brosch, R., (2006), *Infect Immun.* **74**, 88-98.
90. Odugbemi, T., Ademidun, O., Agbabiaka, A. and Banjo, T., (1992), *Ethiop Med J.* **30**, 33-36.
91. Di Martino, D., Ponzoni, M., Cornaglia-Ferraris, P. and Tonini, G.P., (1990), *Cell Mol Neurobiol.* **10**, 459-470.
92. Gagneaux, V. and Shaver, D.V., Jr., (2002), *Nurs Res.* **26**, 42-46.
93. Osicka, R., (2002), *Disertacni prace, VSCHT, Praha.*
94. Kimmel, S.R., (2002), *Am Fam Physician.* **66**, 2113-2120.
95. Merz, A.J. and So, M., (2000), *Annu Rev Cell Dev Biol.* **16**, 423-457.

96. Nassif, X., Beretti, J.L., Lowy, J., Stenberg, P., O'Gaora, P., Pfeifer, J., Normark, S. and So, M., (1994), *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**, 3769-3773.
97. Virji, M., Kayhty, H., Ferguson, D.J., Alexandrescu, C., Heckels, J.E. and Moxon, E.R., (1991), *Mol Microbiol.* **5**, 1831-1841.
98. Ram, S., Mackinnon, F.G., Gulati, S., McQuillen, D.P., Vogel, U., Frosch, M., Elkins, C., Guttormsen, H.K., Wetzler, L.M., Oppermann, M., Pangburn, M.K., and Rice, P.A., (1999), *Mol Immunol.* **36**, 915-928.
99. Vogel, U. and Frosch, M., (1999), *Mol Microbiol.* **32**, 1133-1139.
100. Schryvers, A.B. and Stojiljkovic, I., (1999), *Mol Microbiol.* **32**, 1117-1123.
101. Parsons, H.K., Vitovski, S. and Sayers, J.R., (2004), *Biochem Soc Trans.* **32**, 1130-1132.
102. Plaut, A.G., Gilbert, J.V., Artenstein, M.S. and Capra, J.D., (1975), *Science.* **190**, 1103-1105.
103. Thompson, S.A., Wang, L.L., West, A. and Sparling, P.F., (1993), *J Bacteriol.* **175**, 811-818.
104. Thompson, S.A. and Sparling, P.F., (1993), *Infect Immun.* **61**, 2906-2911.
105. Prochazkova, K., Osicka, R., Linhartova, I., Halada, P., Sulc, M. and Sebo, P., (2005), *J Biol Chem.* **280**, 3251-3258.
106. Dobson, S.R., Kroll, J.S. and Moxon, E.R., (1992), *Infect Immun.* **60**, 618-622.
107. Wooldridge, K.G., Kizil, M., Wells, D.B. and Ala'aldeen, D.A., (2005), *Infect Immun.* **73**, 5554-5567.
108. Genco, C.A. and Desai, P.J., (1996), *Trends Microbiol.* **4**, 179-184.
109. Thomas, C.E. and Sparling, P.F., (1994), *Mol Microbiol.* **11**, 725-737.
110. Panina, E.M., Mironov, A.A. and Gelfand, M.S., (2001), *Nucleic Acids Res.* **29**, 5195-5206.
111. Prochazkova, K., (2005), *Disertacni prace*, VSCHT, Praha
112. Osicka, R., Prochazkova, K., Sulc, M., Linhartova, I., Havlicek, V. and Sebo, P., (2004), *J Biol Chem.* **279**, 24944-24956.
113. Osicka, R., Kalmusova, J., Krizova, P. and Sebo, P., (2001), *Infect Immun.* **69**, 5509-5519.

114. Chong, S., Mersha, F.B., Comb, D.G., Scott, M.E., Landry, D., Vence, L.M., Perler, F.B., Benner, J., Kucera, R.B., Hirvonen, C.A., Pelletier, J.J., Paulus, H., and Xu, M.Q., (1997), *Gene*. **192**, 271-281.
115. Mao, H., (2004), *Protein Expr Purif*. **37**, 253-263.
116. Vasicova, P., Patek, M., Nesvera, J., Sahn, H. and Eikmanns, B., (1999), *J Bacteriol*. **181**, 6188-6191.
117. Osicka, R., Osickova, A., Basar, T., Guermonprez, P., Rojas, M., Leclerc, C. and Sebo, P., (2000), *Infect Immun*. **68**, 247-256.
118. Sebo, P., Glaser, P., Sakamoto, H. and Ullmann, A., (1991), *Gene*. **104**, 19-24.
119. Bradford, M.M., (1976), *Anal Biochem*. **72**, 248-254.
120. El Azami El Idrissi, M., Ladant, D. and Leclerc, C., (2002), *Toxicon*. **40**, 1661-1665.
121. Schlecht, G., Loucka, J., Najar, H., Sebo, P. and Leclerc, C., (2004), *J Immunol*. **173**, 6089-6097.
122. Marchesini, M.I., Ugalde, J.E., Czibener, C., Comerci, D.J. and Ugalde, R.A., (2004), *Microb Pathog*. **37**, 95-105.
123. Norton, P.A. and Coffin, J.M., (1985), *Mol Cell Biol*. **5**, 281-290.
124. Kenny, B., Haigh, R. and Holland, I.B., (1991), *Mol Microbiol*. **5**, 2557-2568.

## 9 Seznam použitých zkratek a symbolů

ABC	membránový transportér (z angl. <b>A</b> TP <b>B</b> inding <b>C</b> assette)
AC	adenylátcyklasa, adenylátcyklasový, -á, -é
ACT	adenylátcyklasový toxin (= CyaA)
ACP	acyl přenášející protein (z angl. <b>A</b> cyl- <b>C</b> arrier <b>P</b> rotein)
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
Amp	ampicilin
APC	antigen-prezentující buňka (z angl. <b>A</b> ntigen- <b>P</b> resenting <b>C</b> ell)
ApxI-IVA	RTX proteiny <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
APS	persulfát amonný
Asp	kyselina asparagová
<i>Bp</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
pb	páry basí
BSA	hovězí sérový albumin
<i>bvg</i>	<b><i>B</i>ordetella <i>v</i>irulence <i>g</i>ene</b>
<i>bvgA</i>	gen kódující cytoplasmatický aktivátor transkripce BvgA
<i>bvgS</i>	gen kódující transmembránový protein BvgS
CaM	kalmodulin
cAMP	adenosin-3',5'-(cyklický) monofosfát
CAT	chloramfenikol acetyltransferasa
<i>cat</i>	gen pro chloramfenikol acetyltransferasu
CBD	chitin-vazebná doména (z angl. <b>C</b> hitin- <b>B</b> inding <b>D</b> omain)
CBS	vazebné místo pro kalmodulin (z angl. <b>C</b> almodulin <b>B</b> inding <b>S</b> ite)
CD	klastr diference
CHO	buněčná linie izolovaná z vaječníků křečka zlatého (z angl. <b>C</b> hinese <b>H</b> amster <b>O</b> vary cell line)
CPM	počet impulsů za minutu (z angl. <b>C</b> ounts <b>P</b> er <b>M</b> inute)
CR 3	komplementový receptor typu 3
CRMC3	linie anti-MaE CD4 <sup>+</sup> T-buněčných hybridomů

CTLL	linie cytotoxických T-lymfocytů
CyaA	adenylátcyklasový toxin (= ACT)
<i>cyaA</i>	gen kódující adenylátcyklasový toxin
<i>cyaB</i>	gen kódující jeden z proteinů zajišťujících sekreci adenylátcyklasového toxinu
CyaC	acyltransferasa zajišťující posttranslační modifikaci ACT mastnou kyselinou
<i>cyaC</i>	gen kódující acyltransferasu umožňující posttranslační modifikaci adenylátcyklasového toxinu mastnou kyselinou
<i>cyaD</i>	gen kódující jeden z proteinů zajišťujících sekreci adenylátcyklasového toxinu
<i>cyaE</i>	gen kódující jeden z proteinů zajišťujících sekreci adenylátcyklasového toxinu
λ-DNA	DNA bakteriofága lambda
DEAE	diethylaminoethyl
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNT	dermonekrotický toxin bakterie <i>B. pertussis</i>
dNTP	deoxyribonuklesidtrifosfát
DPM	počet rozpadů za minutu (z angl. <b>D</b> ecays <b>P</b> er <b>M</b> inute)
dsDNA	dvouvláknová forma DNA
DTT	1,4-dithiothreitol
E5	geneticky provedená detoxifikace adenylátcyklasového toxinu
E7	onkoprotein lidského papiloma viru 16
<i>Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
Fab	antigen-vázající oblast imunoglobulinu
Faktor Xa	proteasa účastnící se procesu srážení krve
FAM20	kmen <i>Neisseria meningitidis</i>
Fc	konstantní část imunoglobulinu
FHA	vláknitý hemaglutinin
FLAG	epitop kódovaný sekvencí MDYKAFDNL
FrpA	železem - regulovaný protein A (z angl. <b>F</b> errum- <b>r</b> egulated <b>p</b> rotein <b>A</b> )

<i>frpA</i>	gen pro železem - regulovaný protein A
FrpC	železem - regulovaný protein C (z angl. <b>F</b> errum- <b>r</b> egulated <b>p</b> rotein <b>C</b> )
<i>frpC</i>	gen pro železem - regulovaný protein C
<i>frpD</i>	gen kódující lipoprotein vnější membrány <i>N.meningitidis</i>
Fur	regulátor transkripce (z angl. <b>F</b> erric <b>u</b> ptake <b>r</b> egulator)
gp120	glykoprotein obálky viru HIV
GSH	glutathion
GST	glutathion-S-transferasa
<i>gst</i>	gen pro glutathion-S-transferasu
GTP	guanidintrifosfát
His	histidin, zde označuje celou sekvenci 6-ti po sobě jdoucích histidinů
HIV-1	virus lidské imunitní nedostatečnosti (z angl. <b>H</b> uman <b>I</b> mmunodeficiency <b>V</b> irus)
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie (z angl. <b>H</b> igh <b>P</b> erformance <b>L</b> iquid <b>C</b> hromatography)
ICAM	molekula intercelulární adheze (z angl. <b>I</b> ntracellular <b>C</b> ell <b>A</b> dhesion <b>M</b> olekule)
Ig	protilátka (imunoglobulin)
IL	interleukin
IPTG	isopropyl β-D-thiogalaktopyranosid
IS1016-V <sub>6</sub>	protein <i>Haemophilus influenzae</i>
kDa	kiloDalton
LacZ	β-galaktosidasa
<i>lacZ</i>	gen pro β-galaktosidasu
LB	Luria-Bertani
LCMV	virus lymfatické choriové meningitidy (z angl. <b>L</b> ymphocytic <b>C</b> horio <b>M</b> eningitis <b>V</b> irus)
LOS	lipooligosacharid
LPS	lipopolysacharid
M <sup>++</sup>	malé bivalentní kationty
MALDI-TOF	hmotnostní spektrometrie (z angl. <b>M</b> atrix <b>A</b> ssisted <b>L</b> aser <b>D</b> esorption/ <b>I</b> onization - <b>T</b> ime <b>O</b> f <b>F</b> light)

MalE	maltosu-vázající protein
<i>malE</i>	gen pro maltosu-vázající protein
MCS	polyklonovací místo (z angl. <b>M</b> ultiple <b>C</b> loning <b>S</b> ite)
MDO	obohacené médium pro kultivaci bakterií
MHC	hlavní histokompatibilitní komplex (z angl. <b>M</b> ajor <b>H</b> istocompatibility <b>C</b> omplex)
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NK	přírodně zabíjející (z angl. <b>N</b> atural <b>K</b> iller)
OD	optická densita
Opa, Opc	proteiny vnější membrány meningokoka (z angl. <b>O</b> uter membrane <b>P</b> rotein A, C)
<i>orf</i>	otevřený čtecí rámec (z angl. <b>o</b> pen <b>r</b> eading <b>f</b> rame)
OVA	ovalbumin
$\alpha$ - <sup>32</sup> P	radioaktivní fosfor s 32 nukleony v ATP, ADP, cAMP
PAGE	elektroforesa v polyakrylamidovém gelu (z angl. <b>P</b> oly <b>A</b> krylamid <b>G</b> el <b>E</b> lectrophoresis)
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. <b>P</b> olymerase- <b>C</b> hain <b>R</b> eaction)
<i>p<sub>lac</sub></i>	laktosový promotor
<i>p<sub><math>\beta</math>-gal</sub></i>	promotor $\beta$ -galaktosidasy
Pro	prolin
PTX	pertusový toxin bakterie <i>B. pertussis</i>
RTX	označení skupiny proteinů (z angl. <b>R</b> epeat in <b>T</b> o <b>X</b> in)
RtxB	ATP-vázající protein vnitřní membrány, součást sekrečního systému typu I
<i>rtxB</i>	gen kódující ATP-vázající protein vnitřní membrány
RtxD	membránový periplasmatický protein, součást sekrečního systému typu I
<i>rtxC</i>	gen kódující membránový periplasmatický protein
RtxE	kanálový protein vnější membrány, součást sekrečního systému typu I
<i>rtxE</i>	gen kódující kanálový protein vnější membrány
SAP	alkalická fosfatasa (z angl. <b>S</b> hrimp <b>A</b> lkaline <b>P</b> hosphatase)
SDS	dodecylsulfát sodný



SDS-PAGE	elektroforesa v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
SPM	samoštěpitelný modul proteinu FrpC (z angl. <b>S</b> elf- <b>P</b> rocessing <b>M</b> odule)
Strep	streptavidin
t	reakční čas [min]
TAP	ABC transportér (z angl. <b>T</b> ransporter <b>A</b> ssociated with antigen <b>P</b> rocessing)
TCF	tracheální kolonizační faktor bakterie <i>Bordetella pertussis</i>
TCR	T-buněčný receptor
TCT	tracheální cytotoxin bakterie <i>Bordetella pertussis</i>
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
U	jednotka (z angl. unit)
V3	variabilní region
VMA	podjednotka ATPasy <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
w.t. ACT	označení pro původní ACT (z angl. <b>w</b> ild <b>t</b> ype)
X	libovolná aminokyselina

