

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Mikrobiologie (P1510)
Studijní obor: 4XMIKR (1510V000)



Mgr. Lucia Motlová

Konformace adenylátcyklázového toxinu *Bordetella pertussis*.
Conformation of the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*.

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: RNDr. Radovan Fišer, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

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

V Praze, 15.10.2021

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat přátelům a rodině za obrovskou podporu a trpělivost, kterou se mnou měli.

Dále si zaslouží velké díky kolegové/přátelé ze všech mých pracovišť: Laboratoř fyziologie bakterií z katedry Genetiky a mikrobiologie, PřF UK, Laboratoř molekulární biologie bakteriálních patogenů, MBÚ CAS, Laboratoř strukturní biologie, BTÚ CAS a Zobrazovací metody, PřF UK, jmenovitě Lucii Jánské, Petře Liškové, Nele Klímové, Ladislavu Bumbovi, Cyrilu Bařinkovi, Janě Nedvědové, Honzovi Komárkovi, Lence Koptašikové, Jánu Sabóvi a i všem ostatním.

V neposlední řadě děkuji svému školiteli Radovanu Fišerovi za podporu při postgraduálním studiu a spoustu inspirace, kterou mi přinesl.

Také bych ráda poděkovala oponentům, že se ujali této práce.

Abstrakt

Tato práce se zabývá uspořádáním RTX („Repeats in ToXin“) domén vybraných RTX toxinů a vlivem těchto struktur především na balení toxinů do nativní struktury jejich sekreci a. Pro strukturní analýzu byly vybrány RTX domény ApxI (*Actinobacillus pleuropneumoniae*-RTX-toxin I) z bakterie *Actinobacillus pleuropneumoniae*, HlyA (Alfa-hemolysin) z bakterie *Escherichia coli* a LtxA (Leukotoxin A) z bakterie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a bloky 4 a 5 RTX domény CyaA (adenylátcyklázový toxin) z bakterie *Bordetella pertussis*. Podařilo se získat a charakterizovat struktury RTX domény LtxA a RTX bloky 5 a 4-5 CyaA. Na základě SAXS (maloúhlový RTG rozptyl) modelu, dříve vyřešených struktur RTX proteinů a zde prezentovaných struktur byly vytvořeny dva modely celé rozsáhlé RTX domény CyaA.

Klíčová slova

Bordetella pertussis, RTX proteiny, adenylátcyklázový toxin, proteinová krystalografie

Abstract

This work is focused on the RTX (Repeats in ToXin) domains structure of selected RTX toxins and its impact on secretion and protein folding. The structural analysis included RTX domains of ApxI (*Actinobacillus pleuropneumoniae*-RTX-toxin I) from *Actinobacillus pleuropneumoniae*, HlyA (Alfa-hemolysin) from *Escherichia coli* and LtxA (Leukotoxin A) from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and blocs 4 a 5 RTX domain CyaA (adenylate cyclase toxin) from *Bordetella pertussis*. The structures of LtxA RTX domain and CyaA RTX blocs 4 and 5 were obtained and characterized. Two models of CyaA RTX domain were built based on SAXS (Small Angle X-ray Scattering) model, previously solved RTX structures and RTX structures presented here.

Key words:

Bordetella pertussis, RTX proteins, adenylate cyclase toxin, protein crystallography

Obsah

Seznam zkratk.....	9
Seznam obrázků	11
Seznam tabulek.....	15
1 Úvod	16
2 Přehled literatury	17
2.1 Rodina RTX proteinů	17
2.1.1 Organizace operonu RTX toxinů.....	17
2.1.2 RTX repetice a bloky.....	18
2.1.3 Sekrece RTX toxinů	19
2.1.4 Vyřešené struktury RTX toxinů.....	21
2.2 Adenylátcyklázový toxin (CyaA) bakterie <i>Bordetella pertussis</i>	23
2.2.1 Bakterie <i>Bordetella pertussis</i>	23
2.2.2 Funkce adenylátcyklázového toxinu (CyaA)	24
2.3 Leukotoxin A (LtxA) bakterie <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	26
2.4 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> -RTX-toxin I (ApXI) bakterie <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	27
2.5 Alfa-hemolysin (HlyA) bakterie <i>Escherichia coli</i>	27
3 Materiál a metody.....	28
3.1 Chemikálie, materiál a přístrojové vybavení.....	28
3.1.1 Seznam použitých chemikálií.....	28
3.1.2 Přístrojové vybavení.....	29
3.1.3 Roztoky a pufry	30
3.1.4 Kultivační média	34
3.1.4.1 Tekutá kultivační média pro bakteriální kultury	34
3.1.4.2 Tuhá kultivační média pro bakteriální kultury	34
3.1.5 Bakteriální kmeny	35
3.1.6 Použité proteinové konstrukty.....	35
3.2 Metody a pracovní postupy	35
3.2.1 Produkce a purifikace proteinových konstruktů.....	35
3.2.1.1 Transformace plazmidové DNA do kompetentních buněk	35
3.2.1.2 Produkce toxinu v 500 ml kulturách	36
3.2.1.3 Příprava extraktu proteinových konstruktů	36
3.2.1.4 Příprava močovinného extraktu proteinového konstruktu RTX ApXI (722-982).....	36
3.2.1.5 Purifikace proteinových konstruktů afinitní chromatografií na Glutathion-Sepharose – Purifikace I.....	37
3.2.1.6 Odstranění Glutathionu dialýzou a štěpení proteinového konstruktu TEV	

	proteázou	37
3.2.1.7	Purifikace proteinových konstruktů afinitní chromatografií na Ni-Sepharse – Purifikace IIa	37
3.2.1.8	Purifikace precipitací GST – Purifikace IIb	38
3.2.1.9	Gelová filtrace proteinových konstruktů.....	38
3.2.2	Stanovení vlastností a množství proteinových konstruktů.....	38
3.2.2.1	SDS-polyakrylamid elektroforéza.....	38
3.2.2.2	Stanovení koncentrace proteinů	38
3.2.2.3	Western blotting RTX LtxA	39
3.2.2.4	Sekvence RTX LtxA	39
3.3	Proteinová krystalografie proteinových konstruktů	40
3.3.1	Krystalizace proteinových konstruktů.....	40
3.3.1.1	Nasazení proteinových konstruktů na screening podmínek.....	40
3.3.1.2	Krystalizace proteinových konstruktů ve vybraných podmínkách ve visících kapkách	41
3.3.1.3	Optimalizace krystalizace ve visících kapkách.....	42
3.3.2	Příprava krystalů na rentgenovou analýzu	42
3.3.2.1	Získání kryopodmínky a lovení krystalu.....	42
3.3.3	Rentgenová analýza	43
3.3.4	Zpracování dat z rentgenové analýzy.....	43
3.3.4.1	Řešení fázového problému.....	43
3.3.4.2	Stavba modelu proteinové struktury a její rafinace.....	43
3.3.5	Validace finálního model.....	43
4	Výsledky	44
4.1	Krystalizace a řešení struktury vykrystalizovaných proteinových konstruktů.....	44
4.1.1	RTX HlyA (733-976)	44
4.1.1.1	Produkce RTX HlyA (733-976) a krystalizace	44
4.1.2	RTX ApxI (722-982)	46
4.1.2.1	Produkce RTX ApxI (722-982) a její optimalizace.....	46
4.1.2.2	Krystalizace RTX ApxI (722-982)	47
4.1.3	RTX LtxA (722-979).....	48
4.1.3.1	Produkce RTX LtxA (722-979) a její optimalizace	48
4.1.3.2	Krystalizace RTX LtxA (722-979).....	49
4.1.3.3	Zpracování datasetu RTX LtxA	50
4.1.4	RTX CyaA blok 5 (1528-1681).....	52
4.1.4.1	Produkce a krystalizace RTX CyaA blok 5 a získání datasetu ze synchrotronu.....	52

4.1.4.2	Zpracování datasetů a rafinace modelů	53
4.1.4.3	Popis struktury RTX CyaA blok 5	54
4.1.5	RTX CyaA Blok 4-5 (1371-1681)	55
4.1.5.1	Produkce a krystalizace RTX CyaA blok 4-5	55
4.1.5.2	Optimalizace krystalizace RTX CyaA blok 4-5	56
4.1.5.3	Zpracování difrakčních dat a rafinace	56
4.1.5.4	Popis struktury RTX CyaA blok 4-5	58
4.1.5.5	Porovnání SAXS modelem obálky RTX bloku 4-5 s krystalografickou strukturou 6SUS.pdb.....	60
4.2	Vytvoření modelu RTX domény CyaA a jeho porovnání se SAXS modelem obálky	60
5	Diskuze	63
6	Souhrn.....	66
7	Seznam použité literatury	67
8	Seznam publikací autorky	80
9	Souhrn článků, příspěví autorky.....	81
9.1	Souhrn „Calcium-Driven Folding of RTX Domain β -Rolls Ratchets Translocation of RTX Proteins through Type I Secretion Ducts.“ ²⁷	81
9.2	Souhrn „2-Amino adipic Acid-C(O)-Glutamate Based Prostate-Specific Membrane Antigen Ligands for Potential Use as Theranostics.“ ¹²⁸	83
9.3	Souhrn článku „Structural and Computational Basis for Potent Inhibition of Glutamate Carboxypeptidase II by Carbamate-Based Inhibitors.“ ¹³²	85
9.4	Souhrn článku „Novel β - and γ -Amino Acid-Derived Inhibitors of Prostate- Specific Membrane Antigen.“ ¹⁴⁰	86
9.5	Souhrn článku „Structural and in Vivo Characterization of Tubastatin A, a Widely Used Histone Deacetylase 6 Inhibitor.“ ¹⁴⁶	87
9.6	Souhrn článku „Structural Basis of Prostate-Specific Membrane Antigen Recognition by the A9g RNA Aptamer.“ ¹⁵⁶	89
9.7	Souhrn článku „Continuous Assembly of β -Roll Structures Is Implicated in the Type I-Dependent Secretion of Large Repeat-in-Toxins (RTX) Proteins.“ ⁴⁰	91
9.8	Souhrn článku „Development of PSMA-1007-Related Series of 18F- Labeled Glu-Ureido-Type PSMA Inhibitors.“ ¹⁶⁶	92
10	Přílohy	i
10.1	Sekvence proteinových produktů	i
10.2	Publikace autora	iii

Seznam zkratek

ABC	ATP-vazebná doména (z angl. ATP Binding Cassette)
AC	adenylátcyklázový (z angl. Adenylate Cyclase)
AK	AminoKyselina /aminokyseliny
APC buňky	Antigen prezentující buňky (z angl. Antigen Presenting Cells)
APS	persulfát amonný (z angl. Ammonium PerSulfate)
ApxI	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> -RTX-toxin I
ATB	AnTiBiotikum
ATZ	anilin thiazolinon (z angl. AnilinoThiaZolinone)
BDNF	mozkový neurotrofní faktor (z angl. Brain Derived Neurotrophic Factor)
BTLCP	z angl. Bacterial Transglutaminase-Like Cysteine Proteinase
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. Bovine Serum Albumine)
CCP4	z angl. Collaborative Computational Project Number 4
CD	Cirkulární Dichroismus
CyaA	adenylátcyklázový toxin
Da	Dalton (jednotka molekulové hmotnosti)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. DeoxyriboNucleic Acid)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. EthyleneDiamineTetraacetic Acid)
EtOH	ethanol
GCPII	Glutamát karboxypeptidáza II (z angl. Glutamate CarboxyPeptidase II); PSMA
GCPIII	Glutamát karboxypeptidáza III (z angl. Glutamate CarboxyPeptidase III)
GST	glutathion-S-transferáza (z angl. Glutathione S-Transferase)
HDAC	histon deacetyláza
His-Tag	hexahistidinová značka (z angl. polyHistidine-Tag)
HlyA	Alfa-hemolysin bakterie <i>Escherichia coli</i>
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. High-Performance Liquid Chromatography)
HSF-1	faktor teplotního šoku 1 (z angl. Heat Shock Factor 1)
HSP-90	protein teplotního šoku 90 (z angl. Heat Shock Protein 90)
IF	z angl. Impact factor
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (z angl. Isopropyl β-D-1-ThiogalactoPyranoside)
LB	médium Luria-Bertani pro bakteriální kultury
LFA-1	z angl. Lymphocyte Function associated Antigen-1
LtxA	Leukotoxin A z bakterie <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
MARTX	z angl. Multifunctional Autoprocessing Repeats-in-ToXin Toxin
MDO	komplexní médium pro kultivaci bakterií
MFP	z angl. Membrane Fusion Protein
MIDAS	z angl. a Modern Intelligent Dynamic Alternative Screen
MpAFP	z angl. <i>Marinomonas primoryensis</i> AntiFreeze Protein
MpIBP	z angl. <i>Marinomonas primoryensis</i> Ice Binding Protein
MR	molekulární nahrazení (angl. Molecular Replacement)
NMR	Nukleární Magnetická Rezonance
OD	Optická Densita
OMP	protein vnější membrány (z angl. Outer Membrane Protein)
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (z angl. PolyAcrylAmide Gel Electrophoresis)
PBS	fosfátový pufr (z angl. Phosphate Buffered Saline)
PEG	PolyEthylenGlykol

PET	P ozitronová E misní T omografie
PSMA	z angl. P rostate S pecific M embrane A ntigen (pro prostatu specifický membránový antigen) = GCPII, FOLH1
PVDF	P oly V inyliden D i F luorid
PT	P ertusový T oxin
PTH	fenylthiohydantoin (z angl. P henyl T hio H ydantoin)
RCF	relativní centrifugační zrychlení (z angl. R elative C entrifugal F orce)
RCSB PDB	z angl. the R esearch C ollaboratory for S tructural B ioinformatics P rotein D ata B ank
SAXS	maloúhlový RTG rozptyl z angl. S mall A ngle X -ray S cattering
RPM	frekvence otáčení za minutu (z angl. R evolutions P er M inutes)
RTX	z angl. R epeats in T o X in
SASBDB	z angl. Small Angle Scattering Biological Data Bank
SDS	dodecylsulfát sodný (z angl. S odium D odecyl S ulfate)
TEMED	N,N,N',N' - T etra M ethylethylen D iamin
TEV	proteáza viru tabákové mozaiky (z angl. T obacco E dge V irus protease)
TISS	sekreční systém typu 1 (z angl. T ype I S ecretion S ystem)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid
TubA	T ubastatin A
UniProt	z angl. The U niversal P rotein Resource
v/v	z angl. V olume/ V olume jednotka koncentrace
wwPDB	z angl. W orld W ide P rotein D ata B ank
w/v	z angl. W eight/ V olume jednotka koncentrace

Seznam obrázků

- Obr. 1: Typická organizace operonu a domén RTX odvozená od alfa-hemolyzinu A (HlyA) z *E. coli*14. Obecné schéma RTX toxinu a ostatních členů RTX operonu je popsáno na prvním řádku, následuje schéma proteinových produktů se stručným strukturním popisem. K označuje lysinová acylační místa. Pod zkratkou ABC je ATP-vazebná doména ABC transportéru - RTX B. N a C značí N- a C-konce proteinů. Čtyři geny RTX operonu a *tolC* gen jsou reprezentovány boxy, které naznačují směr transkripce těchto genů a jejich velikost. Promotor operonu je vyznačen černým trojúhelníkem a smyčky ukazují rho nezávislá terminační místa. Orientaci a délku transkriptu *hlyCABD* vysvětlují čárkované šipky (platí např. pro *hlyCABD* z *E. coli*15 nebo *apxCABD* z *A. pleuropneumoniae*16. Převzato a upraveno z Frey 20192.17
- Obr. 2: Detail RTX beta-rollu z alkalické proteázy *AprA* z *Pseudomonas aeruginosa* (1KAP.pdb22). Ca^{2+} kationy jsou zobrazeny jako žluté koule. A: Karmínovo fialový beta-roll má zeleně zvýrazněné vápník vazebné obrátky. B: Ukázka oktahedrál ní koordinace Ca^{2+} sekvencí GGXGXD obrátky. Ca^{2+} umístěný na N-konci beta-rollu je nejvíce exponován roztoku a jeho hexakoordinace je uzavřena jednou molekulou vody (malá červená koule). Převzato a upraveno z Baumann 201921.....18
- Obr. 3: Přehled mechanismů sekrece TISS. N- a C- konce proteinu jsou v obrázku vyznačeny, bílé kosočtverce značí RTX repetice. V levém horním rohu obrázků je zobrazena organizace operonu. A: Sekrece bakteriocinu *CvaC* (Kolicin V), jako příklad jedнокrokové sekrece TISS, kdy má transportovaný protein sekreční signál na N-konci, který je během sekrece odštěpen. V tomto případě chybí v operonu gen pro acyltransferázu a *cvaC* gen označuje přímo kolicin V. B: Sekrece *HlyA*, typického příkladu RTX toxinu, je opět jedнокroková. Sekreční signál je lokalizován na C-konci a po transportu není odštěpen. Hned za ním následují RTX repetice (50-60 AK v případě *HlyA*). C: Sekrece RTX adhezinu *LapA* z *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 se sekrečním signálem na C-konci, který je opět následován RTX repeticemi. Proces transportu navíc zahrnuje odštěpení N-konce *LapG* periplazmatickou BLTCP vápník vazebnou proteázou, která je ukotvena a inhibována *LapD* k cytoplazmatické membráně. *LapD* uvolňuje *LapG* po rozštěpení cyklického-di-GMP na lineární pGpG. Převzato a upraveno Smith et al. 201823.20
- Obr. 4: Vybrané příklady krystallografických RTX vyřešených struktur: *Azotobacter vinelandii* mannuronan-C5-epimeráza 2ML2.pdb39 (NMR struktura), *Caulobacter vibroides* protein S-vrstvy 5N8P.pdb36, *Pseudomonas aeruginosa* alkalická proteáza 1KAP.pdb22, *Pseudomonas fluorescence* extracelulární lipáza 2ZVD.pdb44 a *Marinomonas primoryensis* led vazebný protein – doména V 5JUH.pdb49. RTX beta-roll je znázorněn zeleně, „folding core“ fialově, enzymatická doména šedě, Ca^{2+} kationy červeně, atomy kyslíku z molekul vody, které pomáhají koordinovat Ca^{2+} kationy světle modře.22
- Obr. 5: A: Paralelní beta-roll *MpIBP* (3P4G.pdb) umístěný jako druhá doména od C-konce proteinu je obarven duhově od N-konce (modrá) k C-konci (červená). Kyslíkové atomy jsou červené, Ca^{2+} kationy jsou žluté a Mg^{2+} zelené koule. Vodu značí malé červené koule, které pomáhají oktahedrál ní koordinaci Ca^{2+} kationu ležícího nejbliž e C-konci proteinu. B: Pohled do lumen beta-rollu, který je tvořen netradiční RTX repeticí XGTGND-XUXU-GGXUXG-XUX, kde U může být jakákoli nepolární AK, kde a X jakákoli polární AK. Uhlík je označen šedě, dusík modře kyslík červeně. Převzato z Baumann 201921.23
- Obr. 6: Schematická struktura *CyaA*, která obsahuje 1706 AK a skládá se z AC domény (struktura s podjednotkami T25 a T18 v komplexu s kalmodulinem (červeně) převzata z Guo et al. 200580) umístěné na N-konci *CyA* následovaná hydrofóbní doménou (oranžová) a RTX

doménou (zelená)s RTX bloky repetitivní (červené) a na C-konci signální sekvencí (šedě). Velikost barevných bloků odpovídá proporci rozložení počtu AK.....	25
Obr. 7: Schéma funkce CyaA při interakci s hostitelskou membránou. Převzato a upraveno Knapp a Benz 202084.....	26
Obr. 8: Schéma organizace LtxA toxinu.....	26
Obr. 9: Schéma organizace ApxI toxinu.....	27
Obr. 10: Schéma organizace HlyA toxinu.....	27
Obr. 11: SDS-PAGE po jednotlivých krocích produkce a purifikace RTX HlyA.....	45
Obr. 12: Chromatogram gelové filtrace RTX HlyA na koloně Superdex200 v jednotlivých pufrách, které měli zlepšit rozpustnost RTX HlyA v roztoku. TNC1 pufr je kontrola. Pufr 2 měl navíc přídavek 5 % glycerolu a pufr 3 0,2 % octyl- β -D-glukopyranosid.....	45
Obr. 13: Porovnání produkce RTX ApxI ve 37 °C a 30 °C pomocí SDS- PAGE gelu. Modře označené dráhy jsou kultury před indukcí exprese RTX ApxI. Červeně jsou označeny dráhy po indukci exprese pomocí IPTG.....	46
Obr. 14: Chromatogram gelové filtrace RTX ApxI po močovinové extrakci v TNC2 pufru na koloně Superdex200.....	47
Obr. 15: Chromatogram gelové filtrace RTX LtxA v 5 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl a 5 mM CaCl ₂ pufru na koloně Superdex200.....	48
Obr. 16: Porovnání SDS-PAGE Purifikace IIa a IIb RTX LtxA, která byla dělána z jedné produkce proteinu. Purifikace IIb srovnatelně efektivní jako Purifikace IIa. Červený obdélník znázorňuje štěpení RTX LtxA v průběhu purifikace. Očekávaná velikost proteinu byla na SDS-PAGE byla cca 37 kDa.....	49
Obr. 17: Asymetrická jednotka krystalu RTX LtxA (modré struktury) s přesahem čtyř molekul ze šesti molekul do dvou sousedních asymetrických jednotek (fialové a zelené struktury). Vápenaté kationy jsou označeny červeně. Verze A a B jsou vůči sobě otočeny o 180° podél osy x.....	51
Obr. 18: SDS-PAGE po jednotlivých krocích produkce a purifikace RTX CyaA blok5.....	52
Obr. 19: Strukturní alignment modelů RTX CyaA bloku 5 vyřešených struktur, označených jejich pdb kódy a zpracovaný pomocí software Pymol114 modulem ColorByRMSD (Shandilya S., Vertrees J., Holder T. (2012) ColorByRMSD [python], dostupný na http://www.pymolwiki.org/index.php/ColorByRMSD (použitý 8.9.2015). Molekulové páry jsou obarveny pomocí škály RMSD (Å) v modro-červeném spektru. Zvolená škála RMSD od 0 do 8 neumožňuje vidět prakticky žádné rozdíly kromě jednoho Trp.....	55
Obr. 20A: Strukturní model RTX CyaA blok 4-5 AK 1410-1488 a 1497-1675: RTX blok 4 (fialová), RTX blok 5 (modrá), C-koncové části RTX bloků (duhové), vápenaté iony (červené), molekuly vody, které se podílejí na koordinaci vápenatých ionů (světle modré). Černý kruh znázorňuje flexibilní smyčku, kterou se nepodařilo namodelovat do map elektronových hustot (AK 1489-1497). B: Strukturní alignment všech RTX blok 5 vyřešených struktur: 5CVW.pdb (zelená), 5CXL.pdb A (žlutá), 5CXL.pdb B (červená), 6SUS.pdb (modrá RTX CyaA blok 5, šedá RTX CyaA blok 4. Alignment byl získán z programu PyMOL114 verze 0.7 (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.0.0. Schrödinger, LLC).....	58
Obr. 21: Porovnání přilehlých oblastí RTX bloků: RTX CyaA blok 5 (6SUS.pdb), možné „folding core“ celého CyaA toxinu (modrá); RTX CyaA blok 4 (6SUS.pdb), spojení mezi bloky 4 a 5 (purpurová); druhý RTX blok z extracelulární lipázy z bakterií <i>Pseudomonas</i> sp. (2Z8X.pdb42) (zelená); proteáza z bakterií <i>Serratia</i> sp. (1SRP.pdb28) (oranžová). N-konec je	

označen červenou kuličkou a C-konec černou. Strukturní podobnost těchto modelů je vysoká, ale sekvenční podobnost velmi nízká, což je znázorněno sekvenčním alignmentem zobrazených struktur, který byl proveden v programu Clustal2.1115.	59
Obr. 22: Proložení krystalové struktury 6SUS.pdb (AK – tmavě modrá, Ca kationy – červená, H ₂ O koordinující Ca kationy – světle modrá) a obálky získané ze SAXS dat (světle žlutá)...	60
Obr. 23: Sekvence CyaA RTX domény rozdělená do pěti RTX predikovaných bloků 52,121 s pravidelným beta-rollem tvořeným RTX repeticemi (každá repetice je oddělena mezerou od následující repetice), oblastmi propojující jednotlivé bloky a „folding core“ (kurzíva). 6SUS.pdb je označena červeně, části namodelované na serveru SWISS-MODEL jsou označeny zeleně, ručně namodelované oblasti mezi jednotlivými bloky modře a stejně jako N-konec RTX bloku 4.	61
Obr. 24: Modely CyaA RTX domény vytvořené homologním modelováním (Struktura 6SUS – modrá, zbytek CyaA RTX bloku 4 – fialová, CyaA RTX blok 3 – zelená, CyaA RTX blok 2 – oranžová, CyaA RTX blok 1 – růžová, Ca kationy – červená). A: Pro tvorbu modelu byla použita SAXS struktura jako forma. B: Model byl vytvořený na základě hypotézy, že všechny CyaA RTX bloky na sebe navazují stejně jako CyaA RTX bloky 4 a 5.	62
Obr. 25: Porovnání „folding core“ (fialová) a přechodových oblastí mezi RTX bloky krystalografických struktur RTX proteinů. Propojení mezi RTX bloky vykazují rozdíly v ohebnosti a počtu „folding core“ podobných struktur (akvamarínová). Je zde vidět, že propojení mezi RTX bloky v 2ZVD.pdb44 je mnohem flexibilnější a obsahuje dvě „folding core“ podobné struktury (akvamarínová a modrá). Oproti tomu propojení RTX CyaA bloků 1 a 2 a 2 a 3 (7RAH.pdb41) odpovídá propojení RTX CyaA 4 a 5 (6SUS.pdb celá RTX CyaA doména pravděpodobně tvoří kontinuální beta roll. Ca ²⁺ kationy jsou zobrazeny červenými koulemi, atomy kyslíku z vod koordinujících Ca ²⁺ kationy světle modře, šedě je katalytická doména 2ZVD.pdb lipázy a M1h5 FAB a M2b10 FAB lehké řetězce, zatímco oranžově M1h5 FAB a M2b10 FAB těžké řetězce.	63
Obr. 26: Přehled vyřešených částí CyaA toxinu bakterie Bordetella pertussis a jeden z modelů vytvořených na základě SAXS dat. AC doména je vyznačená modře ⁸⁰ , úsek 411-490 AK, který je esenciální pro translokaci AC domény, je duhově ¹²⁶ , hydrofobní doména s predikovanými hydrofobními alfa helixy zodpovědnými za kanálotvornou aktivitu oranžově. Jednotlivé RTX bloky RTX domény jsou ve schématu označeny oranžově (homologně namodelované) a červeně označeny (struktura 6SUS.pdb). Zároveň je zde zobrazena struktura RTX bloků 1-3 (7RAH.pdb) ⁴¹ , která byla vyřešena v září 2021 a doplňuje model RTX domény.	65
Obr. 27: Grafický abstrakt publikace Bumba et al. 2016 ²⁷ znázorňující upřesněný mechanismus sekrece CyaA.	82
Obr. 28: GCPII komplexy s ligandem DCIBzL – PDB 3D7H (fialová) představujícím kanonickou sekvenci u nízkomolekulárních inhibitorů odvozených od močoviny a ligandem 13b – PDB 6H7Z (tyrkysová), který z testovaných inhibitorů dosáhl nejlepších. Grafický abstrakt převzat a upraven Nakajima et al. 2018 ¹²⁸	84
Obr. 29: Porovnání účinnosti močovinového inhibitoru GCPII ZJ-43 (růžová) s od něj odvozenými karbamáty inhibitoru 5 (zelená) s glutamátem na C-konci a inhibitoru 7 (běžová) s α -ketoglutarátem na C-konci a jejich strukturní porovnání v GCPII interní kavitě. Oranžově jsou označeny Zn kationy. Grafický abstrakt převzat z Bařinka et al. 2019 ¹³²	85
Obr. 30: Schéma odvození β - a γ -aminokyselinové analogů od DCIBzL ¹⁴⁴ až k neúčinnějšímu inhibitoru 13c z této studie a jeho vazba v aktivním místě PSMA. Grafický abstrakt převzat z Kim et al. 2020 ¹⁴⁰	86

Obr. 31: Vlevo: krystalová struktura komplexu drHDAC6-CD2 s TubA detailní pohled na AK zbytky vymezující aktivní místo a substrátový tunel. Fo-Fc mapa elektronových hustot je označena zelenou sítí ($\sigma = 4,0$). TubA (žlutá) a vybrané AK drHDAC6-CD2 (bílo-šedá) mají označeny červeně kyslík a modře dusík. Aktivní místo navíc obsahuje zinečnatý kation (oranžová koule) a molekuly vody (červené koule). Vpravo: Efekt TubA (60 mg/ml, administrovaný intraperitoneálně) na chování myšního modelu a jeho terapeutický potenciál v psychiatrických onemocněních. Grafický abstrakt převzat z Shen et al. 2020146.....88

Obr. 32: A-C: Superpozice uhlíkových atomů komplexu PSMA/A9g a komplexů PSMA/2-PMPA (2JBJ.pdb; panel A) za PSMA/2-EPE (3BI0.pdb; panel B) a PSMA/RNA 2-65(6H7Z.pdb; panel C). Řez PSMA je zobrazen šedě, jeho vnitřní inhibitor-vazebná kapsa bíle, A9g v polo-transparentním zobrazení povrchu oranžově a zinečnaté kationy modře. Části inhibitorů mají označenou P1 oblast červeně a oblast P1' se zinek-vazebným místem zeleně. Sterická kolize (z angl. „clash“) mezi Adenosinem A 10 z A9g aptameru a P1 částí RNA 2-65 je zvýrazněna šipkou (C). D: Analýza kompetice A9g a PSMA specifických inhibitorů pomocí průtokové cytometrie. PC3-PIP buňky (PSMA exprimující) byly pre-inkubovány s 1 μ M inhibitoru. 100 nm Alexa Fluor647 značený A9g byl přidán k buněčné suspenzi a analyzován průtokovou cytometrií (LSRFortessa flow cytometer). Převzato a upraveno Ptacek et al. 2020 Obrázek 8 (Figure 8)156.....90

Obr. 33: Grafický abstrakt z Motlová et al.4091

Obr. 34: Levý panel: Struktura sloučenin 5 (zelená), 7 (tyrkysová) a 9 (fialová) se od sebe liší pouze linkerem B (šedý ovál): L-Glu-L-Glu (5), D-Glu-D-Glu (7), sulfo-Ala-sulfo-Ala (9). Pravý panel: Porovnání vazby sloučenin 5, 7 a 9 na PSMA. Fluronikotinová část sloučeniny 5 je pevně ukotvená v arene-vazebném místě (ABS), což je umožněno geometrií a délkou linkeru B, zatímco fluoronikotinová část sloučenin 7 a 9 je volněji navázaná na povrchu PSMA. Grafický abstrakt převzat a upraven z Cardinale et al. 2020166.93

Seznam tabulek

Tab. 1: Struktury RTX proteinů v RCSB PDB (z angl. the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank PDB). Za názvem proteinu je jeho UniProt kód ⁵¹ . * jsou označeny struktury, které nemají přiřazenou publikaci. Červeně je označen počet repetice, který více odpovídá těmto strukturám. Převzato a aktualizováno (žluté zvýraznění) z Baumann 2019 ²¹	21
Tab. 2: Podmínky nasazení proteinových konstruktů ke screeningu krystalizačních podmínek.	41
Tab. 3: Podmínky vybrané k optimalizaci krystalizace proteinu RTX LtxA.....	50
Tab. 4: Předběžné statistiky sběru datasetu z difraktometru pro krystal LtxA.	50
Tab. 5: Krystalizační podmínky, ve kterých vyrostly proteinové krystaly vybrané k optimalizaci krystalizace ve visících kapkách.	53
Tab. 6: Statistiky sběru dat a rafinace modelů struktur RTX CyaA bloku 5. Hodnoty v závorkách platí pro slupku s nejvyšším rozlišením. Statistiky pro Ramachandranovo vynesení byly získány z MolProbity softwaru ¹¹¹	54
Tab. 7: Statistiky sběru dat a rafinace modelu struktury RTX CyaA bloku 4-5. Hodnoty v závorkách platí pro slupku s nejvyšším rozlišením. Statistiky pro Ramachandranovo vynesení byly získány z MolProbity 4.02b-467 softwaru ¹¹¹	57

1 Úvod

RTX (Repeats in toxin) toxiny jsou velkou rodinou exoproteinů Gram negativních bakterií různých velikostí a rozmanitých funkcí. Patří mezi ně například kanálotvorné toxiny/hemolyziny, jejichž typickým zástupcem je Alfa-hemolysin bakterie *Escherichia coli*, leukotoxiny (leukotoxin bakterie *Mannheimia haemolytica* bakterie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), sekretované enzymy jako metaloproteázy nebo lipázy (extracelulární lipáza z bakterie *Serratia marcescens*), proteiny S-vrstvy (Csx proteiny bakterie *Campylobacter rectus*), bakteriociny (rhizobiocin bakterie *Rhizobium leguminosarum*) nebo MARTX - z angl. Multifunctional Autoprocessing Repeats-in-Toxin Toxin (VcRtxA bakterie *Vibrio cholerae*). Jejich charakteristickými znaky je obsah RTX vápník vazebných nonapeptidových repetice bohatých na glycin, C-terminální sekreční signální sekvence a sekrece z bakteriální buňky pomocí sekrečního systému typu I.

RTX repetice, většinou lokalizované na C-konci molekuly, jsou zcela esenciální pro balení toxinů do nativní struktury, a tedy i pro jejich funkci. Balení RTX toxinů do nativní struktury je závislé na koncentraci vápenatých kationtů v řádu jednotek mM. V cytosolu bakteriální buňky je tato koncentrace přibližně 1000x nižší, k balení tedy dochází při sekreci toxinu do okolního prostředí.

Tato práce se zaměřila na strukturní analýzu RTX domén čtyř zástupců skupin leukotoxinů a hemolyzinů, jejichž producenti jsou významnými savčími/lidskými patogeny: *Bordetella pertussis*, *Escherichia coli*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Cíle práce:

- 1. Získání struktur RTX domén Roentgenovou strukturní krystalografií**
 - a. RTX domény ApxI (*Actinobacillus pleuropneumoniae*-RTX-toxin I) z bakterie *Actinobacillus pleuropneumoniae*
 - b. HlyA (Alfa-hemolysin) z bakterie *Escherichia coli*
 - c. LtxA (Leukotoxin A) z bakterie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
 - d. bloky 4 a 5 RTX domény CyaA (adenylátcyklázový toxin) z bakterie *Bordetella pertussis*
- 2. Popis získaných struktur a jejich porovnání s již vyřešenými RTX strukturami a odhalení společných rysů, které mohou být důležité pro balení do nativní konformace**
- 3. Stavba modelu celé RTX domény CyaA na základě získaných výsledků**

2 Přehled literatury

2.1 Rodina RTX proteinů

Rodina RTX proteinů je velmi rozmanitá. Patří mezi ně kanálotvorné toxiny/hemolyziny, leukotoxiny, sekretované enzymy, proteiny S-vrstvy, bakteriociny, MARTX proteiny a RTX adheziny. Tato práce se zaměřuje především na RTX hemolyziny a leukotoxiny.

Hlavními znaky RTX rodiny je organizace operonu zodpovědného za produkci, sekreci a post-translační modifikaci RTX toxinů a vápník vazebné nonapetidové repetice lokalizované většinou na C- konci molekuly, za kterými je sekreční signální sekvence pro sekreční systém typu I (TISS), který zajišťuje export toxinu z bakteriální buňky¹⁻⁴.

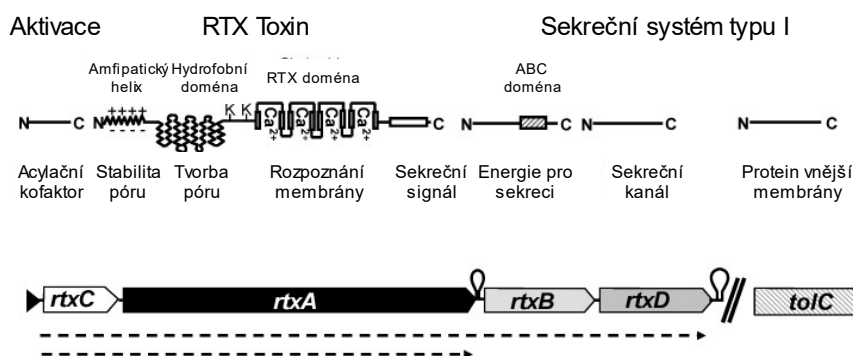
2.1.1 Organizace operonu RTX toxinů

Geny RTX toxinů, proteinů jejich sekrece a post-translační modifikace jsou obvykle lokalizovány na jednom polycistronním operonu *rtxCABD*, až na gen pro protein vnější membrány (OMP) např. TolC, který je využíván i v jiných procesech bakteriální buňky^{5,6} (**Obr. 1**).

Acyl-transferáza, produkt exprese genu *rtxC*, je zodpovědná za post-translační acylaci lysinu pro-RtxA toxinu mastnými kyselinami, která aktivuje biologickou funkci RtxA toxinu^{7,8}. U MARTX proteinů, zatím nebyla prokázána vyšší biologická aktivita po acylaci, i když je *rtxC* gen v jejich operonu přítomen⁹.

Geny *rtxBD* jsou součástí TISS a společně s TolC, nebo jeho homologem, zajišťují sekreci RtxA toxinu z bakteriální buňky. RtxB protein je členem rodiny ABC transportéru, který je lokalizován na cytoplazmatické bakteriální membráně^{10,11}. RtxD je „Membrane Fusion Protein“ (MFP) umožňující přechod sekretovaného RtxA přes periplasmu^{12,13}.

Organizace typického RTX polycistronního operonu je *prtxCAlBD*, kde p je promotor a || značí atenuátor transkripce, který snižuje expresi genů *rtxBD*, jejichž proteinové produkty jako součást transportního systému nejsou potřeba ve vysoké koncentraci na rozdíl od RTX toxinu².

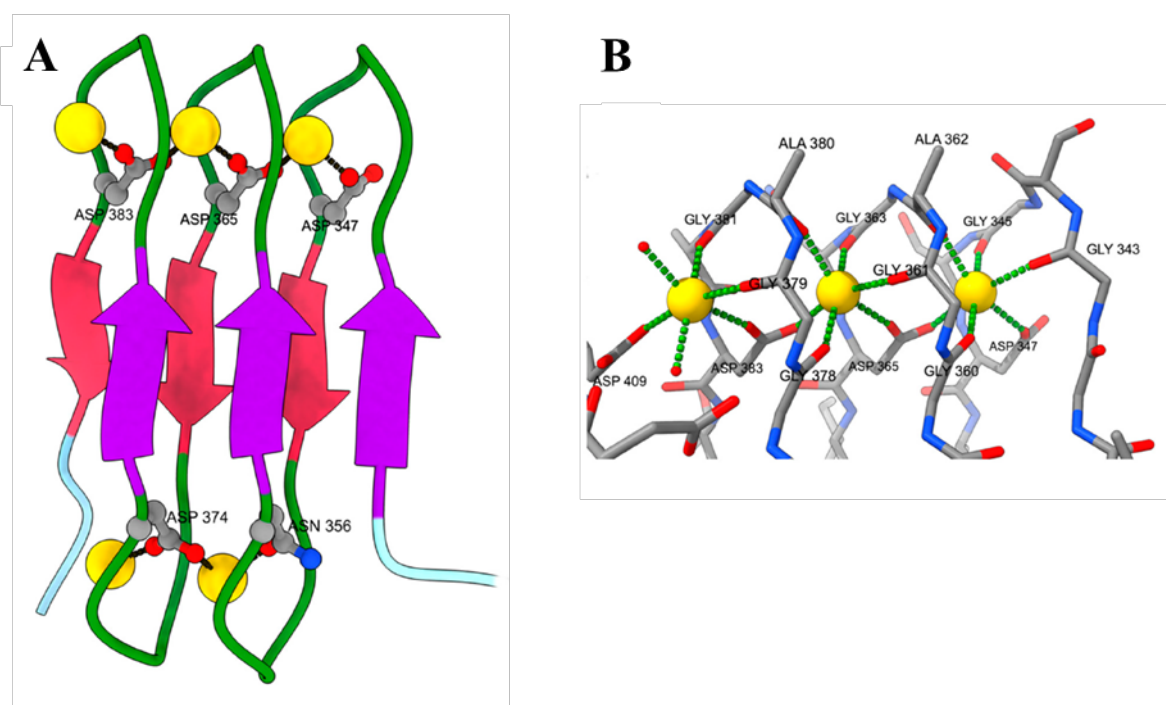


Obr. 1: Typická organizace operonu a domén RTX odvozená od alfa-hemolyzinu A (HlyA) z *E. coli*¹⁴. Obecné schéma RTX toxinu a ostatních členů RTX operonu je popsáno na prvním řádku, následuje schéma proteinových produktů se stručným strukturním popisem. K označuje lysinová acylační místa. Pod zkratkou ABC je ATP-vazebná doména ABC transportéru - RTX B. N a C značí N- a C-konce proteinů. Čtyři geny RTX operonu a *tolC*

gen jsou reprezentovány boxy, které naznačují směr transkripce těchto genů a jejich velikost. Promotor operonu je vyznačen černým trojúhelníkem a smyčky ukazují rho nezávislá terminační místa. Orientaci a délku transkriptu *hlyCABD* vysvětlují čárkované šipky (platí např. pro *hlyCABD* z *E. coli*¹⁵ nebo *apxCABD* z *A. pleuropneumoniae*¹⁶. Převzato a upraveno z Frey 2019².

2.1.2 RTX repetice a bloky

Nonapeptidové repetice obsahují sekvenční konsensus GGXGDXUX, kde X může být kterákoliv aminokyselina (AK) a U je hydrofobní AK například leucin^{4,17,18}. Většinou jsou lokalizované na C-konci, hned za sekrečním signálem. RTX domény obsahují 3-17 RTX repetit na jeden RTX blok, nejčastěji se ale jejich počet pohybuje mezi 5-9. Výjimku tvoří RTX adheziny, kde je počet repetit v rozmezí 25-120¹⁹. Čím blíže je RTX repetice C-konci proteinu, tím je větší pravděpodobnost narušení nonapeptidového konsensu například jeho rozšířením o další AK. Ukázalo se, že tyto nestandardní repetice mají zásadní vliv na balení RTX domény do typické konformace pravotočivého beta-rollu²⁰. XUX část konsensu tvoří krátký beta list a sekvence GGXGXD obrátku, která je zodpovědná za oktahedrální koordinaci Ca^{2+} kationů (**Obr. 2**). Karboxy skupina aspartátu propojuje každou druhou repetici koordinací dvou Ca^{2+} kationů zároveň (**Obr. 2A**). Další ze šesti interakcí zajišťují především karbonylové skupiny AK obrátky a na koncích beta rollového bloku i molekuly vody (**Obr. 2B**)²¹.



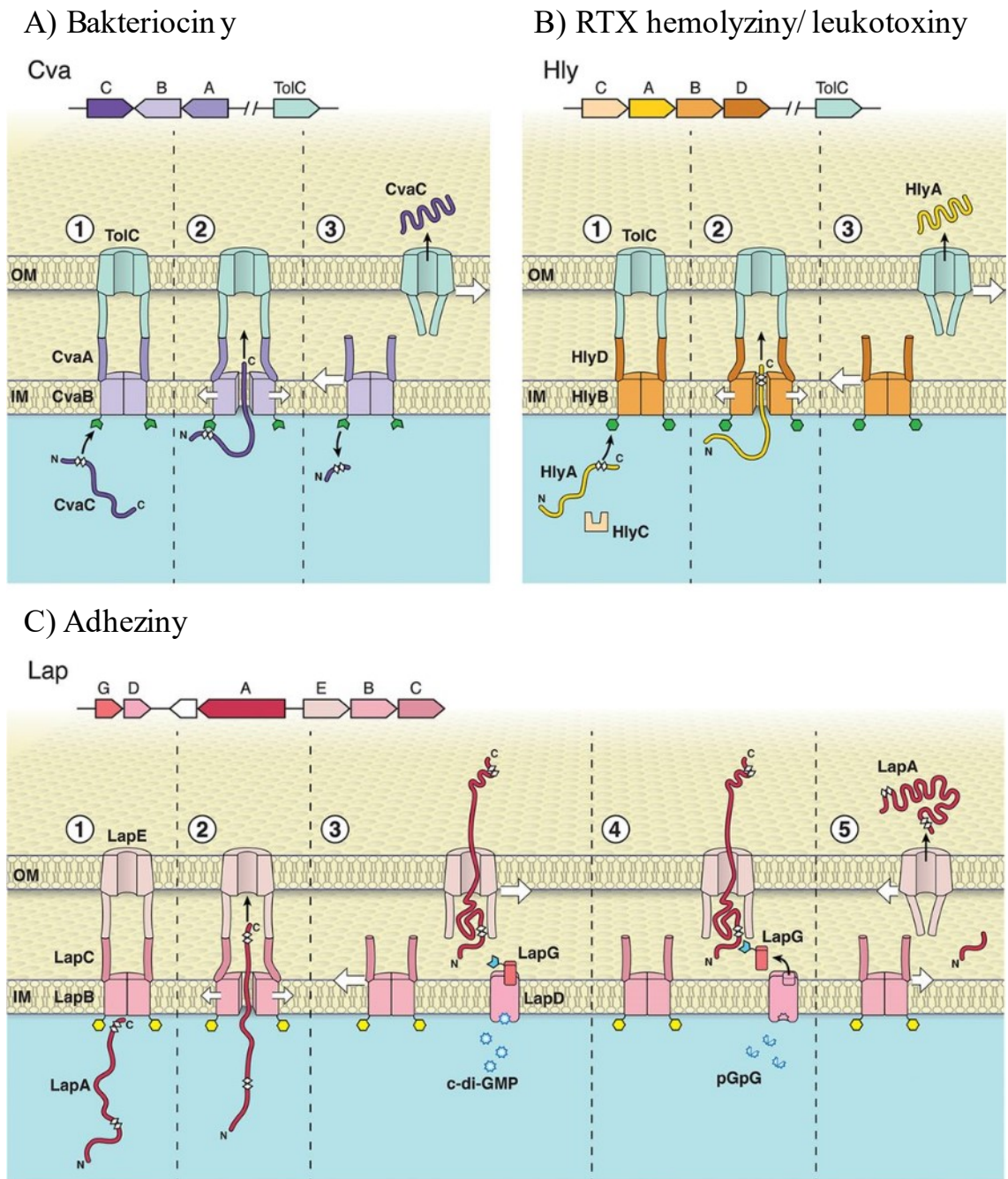
Obr. 2: Detail RTX beta-rollu z alkalické proteázy AprA z *Pseudomonas aeruginosa* (1KAP.pdb²²). Ca^{2+} kationy jsou zobrazeny jako žluté koule. **A:** Karmínovo fialový beta-roll má zeleně zvýrazněné vápník vazebné obrátky. **B:** Ukázka oktahedrální koordinace Ca^{2+} sekvencí GGXGXD obrátky. Ca^{2+} umístěný na N-konci beta-rollu je nejvíce exponován roztoku a jeho hexakoordinace je uzavřena jednou molekulou vody (malá červená koule). Převzato a upraveno z Baumann 2019²¹.

2.1.3 Sekrece RTX toxinů

RTX toxiny jsou sekretovány pomocí bakteriálního sekrečního systému typu 1 (TISS). TISS se skládá z ABC transportéru, MFP proteinu a OMP póru. Složení tohoto komplexu je závislé na substrátu. Signální sekvence nesbaleného RTX proteinu je rozpoznána specifickým ABC transportérem, který je lokalizován na vnitřní membráně bakterie a tvoří komplex s MFP proteinem. Tato interakce způsobí navázání a otevření OMP póru, který není specifický pro jednotlivé TISS a může sloužit více transportním systémům. Po dokončení sekrece se ABC transportér/MFP komplex odváže od OMP, který se tím vrátí do zavřeného stavu (**Obr. 3A, B**)²³.

TISS se dělí se do tří skupin, podle mechanismu sekrece. Skupina bakteriocinů **Obr. 3A** a RTX toxinů **Obr. 3B** je sekretovaná jedнокrokově a liší se pozicí sekrečního signálu, kdy u bakteriocinů leží na N-konci a po sekreci je odštěpen²⁴ a u RTX toxinů na C-konci^{13,25}. Skupina BTLCP (z angl. Bacterial Transglutaminase-Like Cysteine Proteinase)²⁶ závislých RTX adhezinů **Obr. 3C**, která má sekreční signál na C-konci, je sekretována ve dvou krocích a tomto případě zůstává transportovaný protein navázaný na vnější membránu bakterie. Druhým krokem sekrece je uvolnění adhezinu z buněčného povrchu bakterie. Tento proces je regulován koncentrací cyklického di-GMP v buňce.

Pro sekreci je zároveň důležitá vysoká (milimolární) koncentrace Ca^{2+} ve vnějším prostředí pro úspěšné sbalení proteinu do nativní konformace a sekreci, která získává část energie nutnou pro export RTX proteinu právě Ca^{2+} závislým balením RTX repetice na povrchu buňky. Zároveň část sbaleného proteinu ve vnějším prostředí zabraňuje prokluzování zpět do cytosolu. Počet RTX repetice také koreluje s velikostí exportovaného RTX proteinu²⁷.



Obr. 3: Přehled mechanismů sekrece TISS. N- a C- konce proteinu jsou v obrázku vyznačeny, bílé kosočtverce značí RTX repetice. V levém horním rohu obrázků je zobrazena organizace operonu. **A:** Sekrece bakteriocinu CvaC (Kolicin V), jako příklad jedнокrokové sekrece TISS, kdy má transportovaný protein sekreční signál na N-konci, který je během sekrece odštěpen. V tomto případě chybí v operonu gen pro acyltransferázu a *cvaC* gen označuje přímo kolicin V. **B:** Sekrece HlyA, typického příkladu RTX toxinu, je opět jedнокroková. Sekreční signál je lokalizován na C-konci a po transportu není odštěpen. Hned za ním následují RTX repetice (50-60 AK v případě HlyA). **C:** Sekrece RTX adheziny LapA z *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 se sekrečním signálem na C-konci, který je opět následován RTX repeticemi. Proces transportu navíc zahrnuje odštěpení N-konce LapG periplazmatickou BLTCP vápník vazebnou proteázou, která je ukotvena a inhibována LapD k cytoplazmatické membráně. LapD uvolňuje LapG po rozštěpení cyckického-di-GMP na lineární pGpG. Převzato a upraveno Smith *et al.* 2018²³.

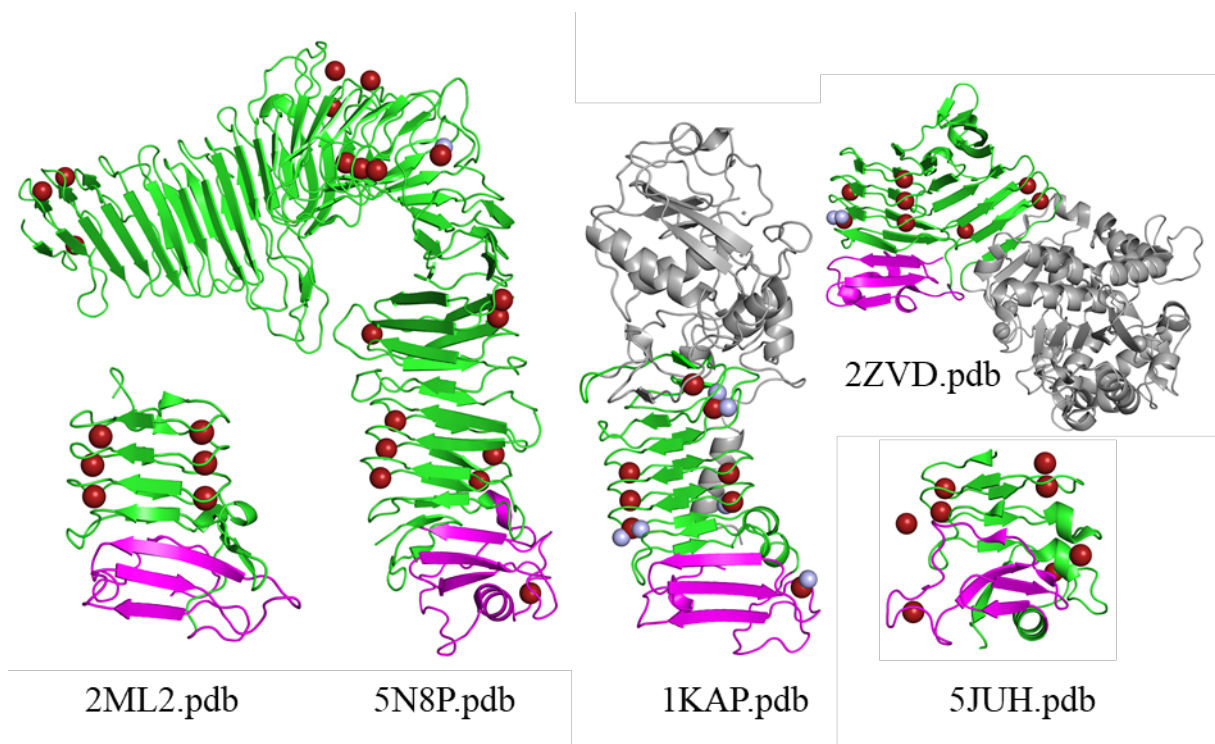
2.1.4 Vyřešené struktury RTX toxinů

Nejstarší vyřešenou krystalografickou strukturou je podle RCSB databáze molekula alkalické proteázy bakterie *Pseudomonas aeruginosa* z roku 1993²², ačkoli byla opublikována až na podzim roku 1995 po několika dalších proteázách z bakterie *Pseudomonas aeruginosa*^{28,29} nebo *Serratia marcescens*^{28,30,31}. Struktura obsahuje N-terminální enzymatickou doménu a C-terminální RTX doménu, která má typickou strukturu RTX toxinů. Jedná se o pravotočivý beta-roll složený z RTX repetit o konsensu GGXGXDXUX. Všechny struktury RTX rodiny, které byly dodnes vyřešeny jsou shrnuty v **Tab. 1** převzaté z Baumann 2019 a aktualizované na konci září 2021.

Organismus Protein	PDB Entry	Počet repetit GGXGXDXUX
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> alkalická proteáza APRA PSEAE	1KAP ²² ; 1JIW ³² ; 1AKL ²⁹ ; 3VII*	5
<i>Serratia marcescens</i> metaloproteáza PRZN SERMA	1SAT ³⁰ ; 1SMP ³¹ ; 1AF0*; 4I35*; 5D7W ³³	5
<i>Serratia marcescens</i> sp. metaloproteáza PRTZN SERME	1SRP ²⁸	5
<i>Erwinia/Dickeya chrysanthemi</i> metaloproteáza PrtC PRTC_DICCH	1GO7, 1GO8 ³² ; 1K7G, 1K7I, 1K7Q ³⁴ ; 3HB2, 3HBU, 3HBV, 3HDA ³⁵	5
<i>Caulobacter vibroides</i> protein S-vrstvy A0A0H3C8J1 CAUVN	5N97, 5N8P ³⁶ ; 6P5T ³⁷	4
<i>Azotobacter vinelandii</i> mannuronan-C5-epimeráza ALGE4 AZOVI	2AGM ³⁸ ; 2ML1, 2ML2, 2ML3 ³⁹	6
<i>Bordetella pertussis</i> adenylátcyklázový toxin CYAA BORP1	5CVW, 5CXL ²⁷	9
<i>Bordetella pertussis</i> adenylátcyklázový toxin CYAA BORPE	6SUS ⁴⁰	9 + 8
<i>Bordetella pertussis</i> adenylátcyklázový toxin A0A380ZZA1 BORPT	7RAH ⁴¹	3 + 8 + 8
<i>Serratia marcescens</i> lipáza LipA Q5933 SERMA	2QUA, 2QUB ¹⁷	5 + 8
<i>Pseudomonas fluorescence</i> extracelulární lipáza Q9RBY1 9PSED	2Z8X, 2Z8Z ⁴² ; 2ZJ6, 2ZJ7 ⁴³ ; 2ZVD, 3A6Z, 3A70 ⁴⁴	5 + 8
<i>Pseudomonas</i> sp. psychrofilní TAC II 18 metaloproteáza O69771 9PSED	1H71, 1G9K ⁴⁵ ; 1O0Q, 1O0T, 1OM6, 1OM7, 1OM8, 1OMJ ⁴⁶	5
<i>Flaviobacterium</i> sp. YS-80-122 alkalická metaloproteáza DOVMS8 9FLAO	3U1R ⁴⁷ ; 6IXX*	5
<i>Marinomonas primoryensis</i> led vazebný protein – doména IV A1YIY3 9GAMM	3P4G ⁴⁸	12 19 AK/repetici
<i>Marinomonas primoryensis</i> led vazebný protein – doména V A1YIY3 9GAMM	5JUH ⁴⁹	4
Složený model <i>Caulobacter crescentus</i> S-vrstvy navázaný na O-antigen LPS SLAP CAUVC	6Z7P ⁵⁰	

Tab. 1: Struktury RTX proteinů v RCSB PDB (z angl. the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank PDB). Za názvem proteinu je jeho UniProt kód⁵¹. * jsou označeny struktury, které nemají přiřazenou publikaci. Červeně je označen počet repetit, který více odpovídá těmto strukturám. Převzato a aktualizováno (žluté zvýraznění) z Baumann 2019²¹.

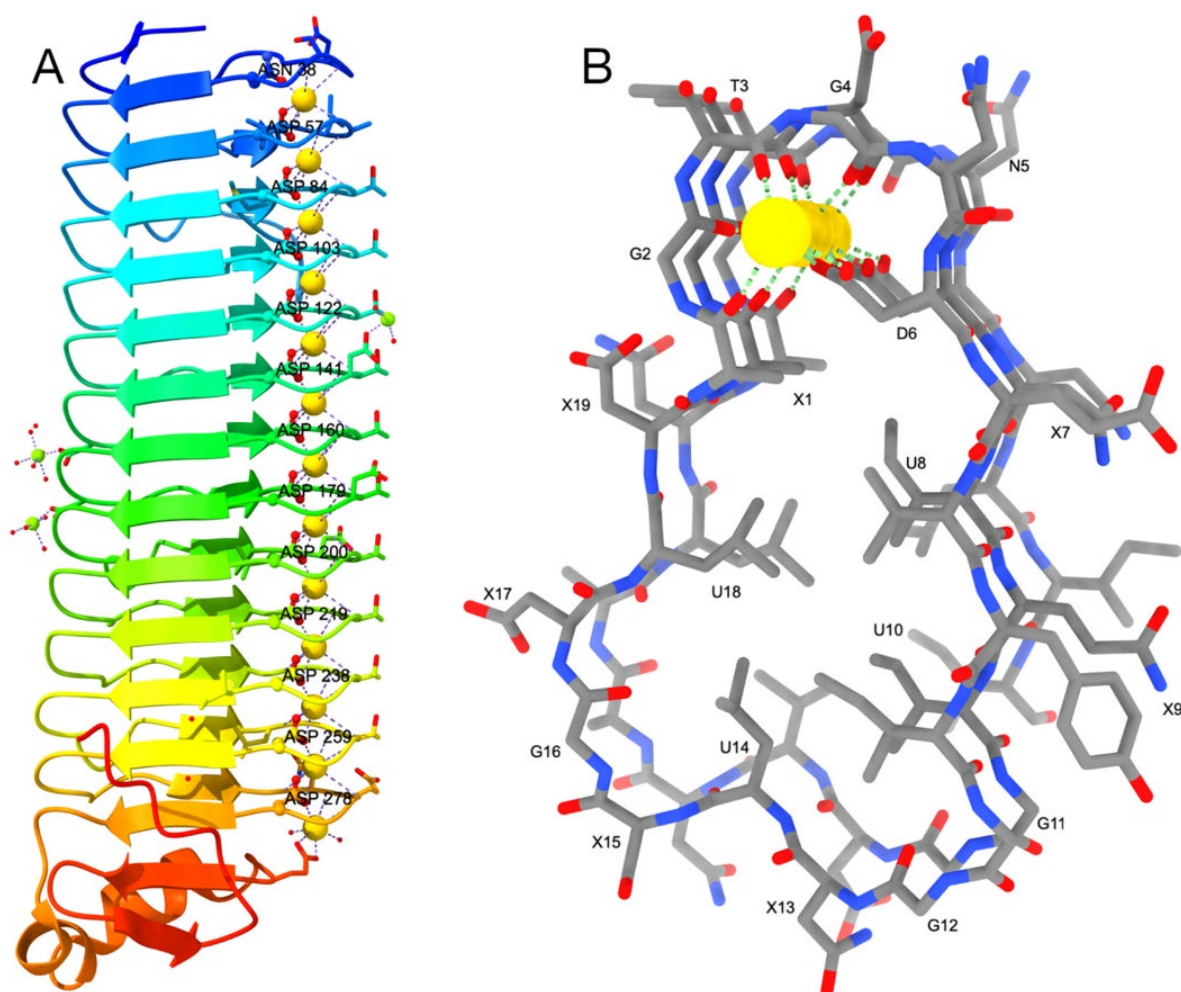
Struktura RTX domény je u všech proteinů podobná až na adheziny a proteiny S-vrstvy. Před sekrecí jsou proteiny v bakteriálním cytosolu vnitřně neuspořádané a tzv. „folding core“^{27,52–54} na začátku sekrece začíná Ca^{2+} závislé balení do nativní konformace v extracelulárním prostoru. Tzv. „folding core“ se skládá obvykle ze čtyř beta-listů. Tři z nich jsou antiparalelně orientovány na jedné straně „beta-rollu“ RTX repetice, beta-list nejbližší C-konci proteinu se potom stáčí na druhou stranu beta rollu. Následuje sekreční signál, který obvykle čítá kolem 60 AK. Ačkoli je „folding core“ pro RTX toxiny esenciální, existuje jen nízká sekvenční podobnost, této domény mezi RTX proteiny, i když strukturně vypadají velmi podobně (**Obr. 4** označené fialově). Na druhou stranu balení RTX domén do nativní konformace je do značné míry proces poháněný snížením entropie C-konce. Shur *et al.* v roce 2011 ukázal, že „folding core“ mohlo být nahrazeno pevným substrátem a k vápník závislému sbalení proteinu stejně došlo. Další možností balení RTX domény do nativní konformace bez „folding core“ je přidání molekulárního zahušťovacího činidla jako je PEG (Polyethylenglykol), které způsobí kýžené snížení entropie a umožní sbalení RTX domény za přítomnosti 3 mM koncentrace Ca^{2+} kationů⁵⁵.



Obr. 4: Vybrané příklady krystalografických RTX vyřešených struktur: *Azotobacter vinelandii* mannuronan-C5-epimeráza 2ML2.pdb³⁹ (NMR struktura), *Caulobacter vibroides* protein S-vrstvy 5N8P.pdb³⁶, *Pseudomonas aeruginosa* alkalická proteáza 1KAP.pdb²², *Pseudomonas fluorescense* extracelulární lipáza 2ZVD.pdb⁴⁴ a *Marinomonas primoryensis* led vazebný protein – doména V 5JUH.pdb⁴⁹. RTX beta-roll je znázorněn zeleně, „folding core“ fialově, enzymatická doména šedě, Ca^{2+} kationy červeně, atomy kyslíku z molekul vody, které pomáhají koordinovat Ca^{2+} kationy světle modře.

Led vázající protein MpIBP (z angl. *Marinomonas primoryensis* ice binding protein, nebo MpAFP z angl. *Marinomonas primoryensis* antifreeze protein⁵⁶) patřící k RTX adhezivům produkovaný *Marinomonas primoryensis* má netypickou RTX doménu RIV lokalizovanou směrem k N-konci hned za klasickou RTX doménou RV na C-konci. Tento protein o velikosti

1,5 MDa je vázaný k vnější membráně a snižuje teplotu tuhnutí okolní vody skrze svoji interakci s ledem, a také ukotvuje bakterii k rozsivkám⁴⁹. RIV je led vazebná doména, která místo 18 AK (2 typické nonapetidové repetice) na jeden kompletní beta-roll obsahuje 19 AK o sekvenci XGTGND-XUXU-GGXUXG-XUX, kde prvních šest AK tvoří Ca^{2+} -vazebnou otáčku následovanou beta listem se čtyřmi AK. Dalších šest AK tvoří druhou otáčku, která ovšem neváže Ca^{2+} kationy a neobsahuje aspartát. Poslední 3 AK tvoří druhý beta list. Výsledkem je asymetrický beta-roll s Ca^{2+} kationy navázanými pouze na jedné straně beta-rollu (**Obr. 5**)²¹.



Obr. 5: **A:** Paralelní beta-roll MpiBP (3P4G.pdb) umístěný jako druhá doména od C-konce proteinu je obarven duhově od N-konce (modrá) k C-konci (červená). Kyslíkové atomy jsou červené, Ca^{2+} kationy jsou žluté a Mg^{2+} zelené koule. Vodu značí malé červené koule, které pomáhají oktahedrál ní koordinaci Ca^{2+} kationu ležícího nejbližší C-konci proteinu. **B:** Pohled do lumen beta-rollu, který je tvořen netradiční RTX repeticí XGTGND-XUXU-GGXUXG-XUX, kde U může být jakákoli nepolární AK, kde a X jakákoli polární AK. Uhlík je označen šedě, dusík modře kyslík červeně. Převzato z Baumann 2019²¹.

2.2 Adenylátcyklázový toxin (CyaA) bakterie *Bordetella pertussis*

2.2.1 Bakterie *Bordetella pertussis*

Ve své práci se zabývám adenylátcyklázovým toxinem, který je produkován bakterií

Bordetella pertussis. *Bordetella pertussis* je gramnegativní striktně aerobní kokobacil bez pouzdra. Způsobuje velmi závažné onemocnění dýchacího traktu (černý/dávivý kašel/pertuse) přenosné kapénkovou infekcí, které může být fatální pro kojence a před vyvinutím vakcíny, bylo jedním z hlavních příčin jejich úmrtí^{57,58}. Původce onemocnění izolovali a identifikovali Jules Bordet a Octave Gengou v roce 1906⁵⁹. V 30. letech 20. století americká pediatrička Leila Alice Denmark vyvinula celulární vakcínu ve spolupráci s farmaceutickou firmou Eli Lilly and Company. V roce 1940 byla zkombinována s toxoidy z tetanu a záškrtu. V 90. letech byla nahrazena acelulární vakcínou kvůli vedlejším účinkům celulární vakcíny⁶⁰. V České republice je součástí hexavakcíny (vakcíny proti černému kašli, přenosné dětské obrně, tetanu, záškrtu, žloutence typu B a onemocněním vyvolaným bakterií *Haemophilus influenzae* typu b.), povinného očkování v kojeneckém věku⁶¹. Součástí vakcíny je inaktivovaný pertusový toxin, hemaglutinin a někdy i pertaktin⁶².

Mezi identifikované a popsané virulentní faktory bakterie *Bordetella pertussis*, jejichž regulaci produkce má na starosti dvoukomponentní systém BvgAS⁶³, patří pertusový toxin (PT, dříve Lymphocytosis-promoting factor)⁶⁴, adenylátcyklázový toxin (CyaA), dermonekrotický toxin⁶⁵, filamentózní hemaglutinin⁶⁶, pertaktin⁶⁷, lipopolysacharid a fimbrie^{68,69}. Této regulaci nepodléhá tracheální cytotoxin⁷⁰.

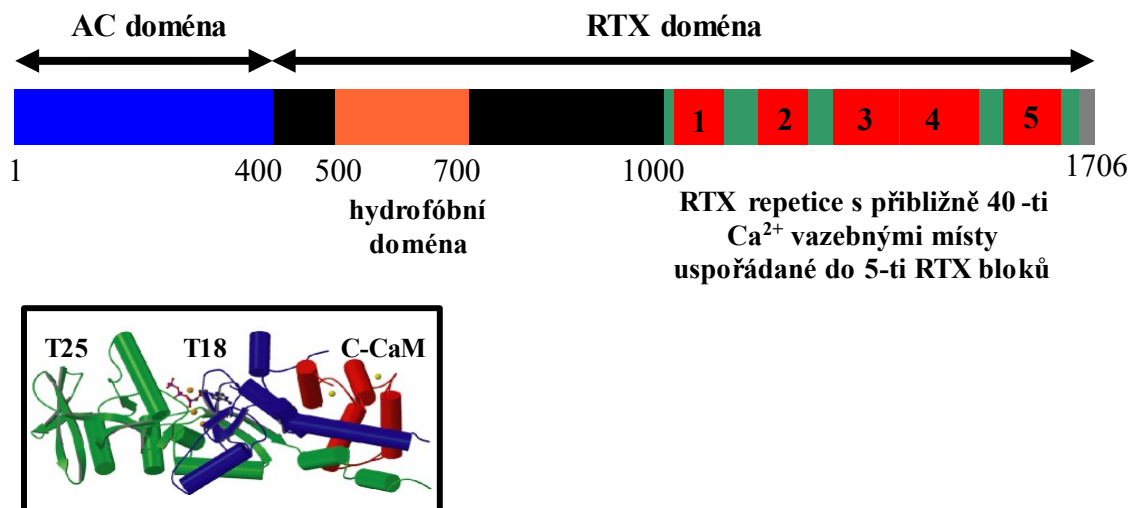
Mezi nejdůležitější toxiny patří PT, který je zodpovědný za většinu symptomů pertuse, hlavně rozsáhlou leukocytózu v plicích, která může být důvodem vážných následků pro kojence⁷¹. PT je obsažen v acelulární vakcíně a jím způsobená míra imunizace může být dostatečná⁷². PT je transportován z bakteriální buňky sekrečním systémem typu 4⁷³. Do cílových eukaryotických buněk se dostává endocytózou. PT se skládá ze dvou domén. A (podjednotka S1) zajišťuje biologickou aktivitu a B doména (podjednotky S2-5, S4 je obsažena 2x), která zprostředkovává vazbu toxinu na cílovou buňku⁷⁴. PT ovlivňuje fyziologii buňky kontrolou produkce cAMP inhibicí inhibitoru (G - proteinu) adenylátcyklázy vázané na cytoplazmatickou membránu a omezí tak buněčnou signalizaci. U neutrofilů tím ovlivňuje například motilitu⁷⁵.

2.2.2 Funkce adenylátcyklázového toxinu (CyaA)

CyaA je druhým nejdůležitějším virulentním faktorem bakterie *Bordetella pertussis*⁷⁶ o velikosti 1706 AK. Ačkoli není součástí acelulární vakcíny, jeho použití spolu s PT by mohlo zvýšit efektivitu vakcinace acelulární vakcínou kvůli jeho potenciálu aktivace imunitního systému⁷⁷. Adenylátcyklázový toxin je kanálotvorný a zároveň cytotoxický⁷⁸. Skládá se z adenylátcyklázové (AC) domény a RTX domény, která obsahuje hydrofobní doménu, jenž umožňuje tvorbu kationsektivního póru. Na C-konci je umístěno 5 bloků RTX repetice schopností navázat 40 Ca²⁺ kationů⁷⁹. Struktura AC domény byla vykryštalizována v komplexu s kalmodulinem, který je důležitý pro akceleraci její funkce konverze ATP na cAMP už v roce 2005 (1YRU.pdb)⁸⁰ (**Obr. 6**). Acylované lysiny (860 AK, 963 AK) důležité pro aktivitu celého CyaA leží mezi hydrofobní a RTX doménou⁸**Obr. 6:** Schematická struktura CyaA, která obsahuje 1706 AK a skládá se z AC domény (struktura s podjednotkami T25 a T18 v komplexu s kalmodulinem (červeně) převzata z Guo *et al.* 2005⁸⁰) umístěné na

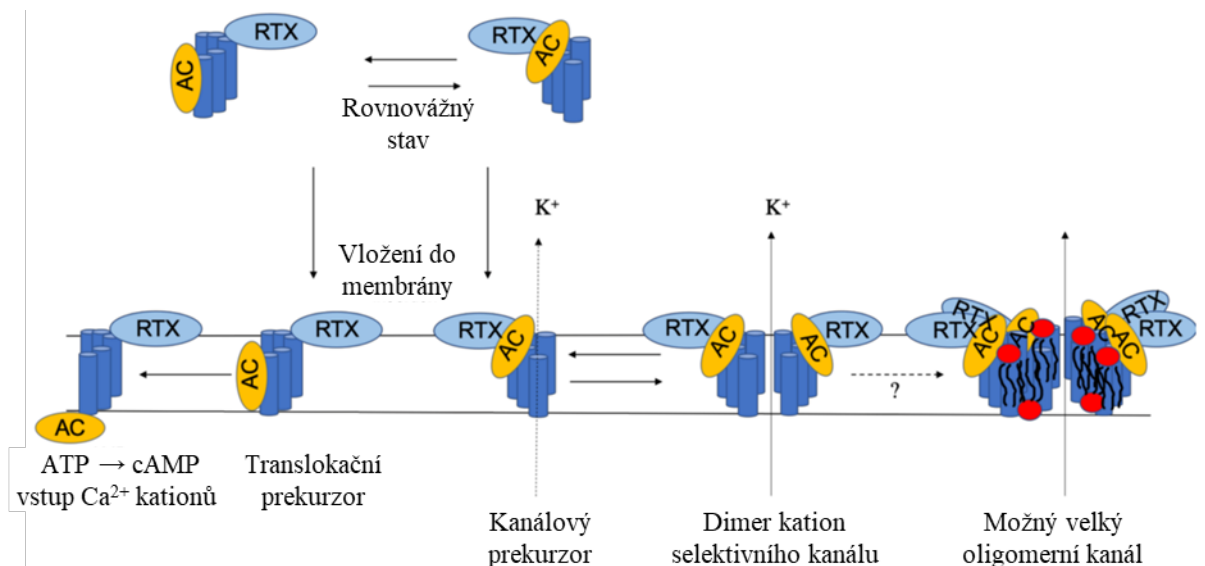
N-konci CyaA následovaná hydrofóbní doménou (oranžová) a RTX doménou (zelená)s RTX bloky repetice (červené) a na C-konci signální sekvencí (šedě). Velikost barevných bloků odpovídá proporci rozložení počtu AK.

CyaA je sekretováno v místě infekce a může způsobit buněčnou smrt nebo ztrátu ochranných funkcí cílových antigen prezentujících buněk (APC z angl. Antigen presenting cells), např. makrofágů nebo dendritických buněk. Mezi tyto schopnosti patří adenylátcyklázová aktivita, která je spuštěna tvorbou komplexu s kalmodulinem hostitelské buňky a způsobí konverzy ATP na cAMP, což způsobí deregulaci hostitelské buňky⁸¹.



Obr. 6: Schematická struktura CyaA, která obsahuje 1706 AK a skládá se z AC domény (struktura s podjednotkami T25 a T18 v komplexu s kalmodulinem (červeně) převzata z Guo *et al.* 2005⁸⁰) umístěné na N-konci CyaA následovaná hydrofóbní doménou (oranžová) a RTX doménou (zelená)s RTX bloky repetice (červené) a na C-konci signální sekvencí (šedě). Velikost barevných bloků odpovídá proporci rozložení počtu AK.

Během translokace také dochází ke vstupu Ca²⁺ kationů⁸² a Cya v tomto případě funguje jako monomer. Druhou možností je tvorba kation selektivního póru, pravděpodobně po oligomerizaci CyaA⁸³ do membrány inzerovaného prekurzoru. Přesný mechanismus interakce s membránou a translokace AC domény stále není znám (**Obr. 7**).

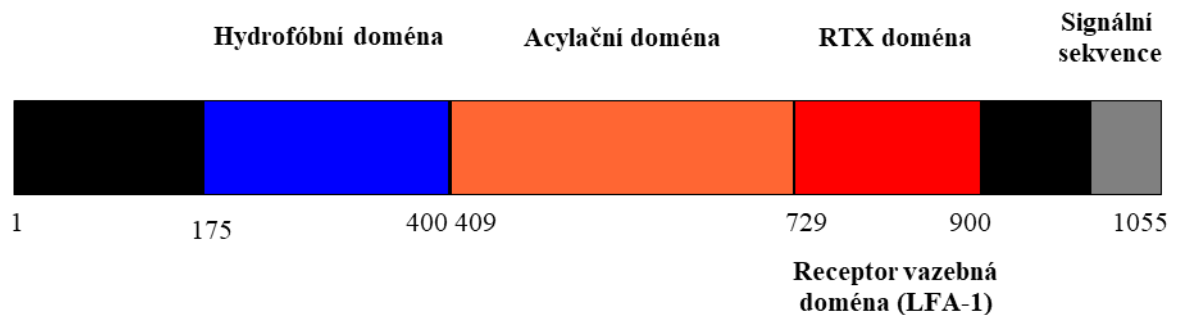


Obr. 7: Schéma funkce CyaA při interakci s hostitelskou membránou. Převzato a upraveno Knapp a Benz 2020⁸⁴.

2.3 Leukotoxin A (LtxA) bakterie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Leukotoxin (LtxA; Leukothera), je protein produkovaný gram negativní fakultativně anaerobní bakterií *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, která způsobuje závažné lidské a opičí periodontitidy a také patří do skupiny HACEK (*Haemophilus spp.*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* a *Kingella kingae*) způsobující vzácné endokarditidy⁸⁵⁻⁸⁷. LtxA se preferenčně váže na LFA-1 receptor (z angl. lymphocyte function associated antigen-1) a β_2 integrin⁸⁸, které jsou přítomné pouze na povrchu všech bílých krvinek, které LtxA zabíjí⁸⁹ spuštěním programované buněčné smrti, několika různými způsoby⁹⁰.

LtxA je protein o velikosti 106 kDa s organizací domén (**Obr. 8**), kdy na C-konci je Signální sekvence a pravděpodobně 1-2 RTX bloky s minimálně 12-ti RTX repeticemi (kap. 10.1). K acylaci nutné pro funkci proteinu dochází na lyzinech 562 a 687⁹¹. Na N-konci se nachází hydrofobní doména zodpovědná za interakci s hostitelskou membránou, která ovšem netvoří póry⁹².



Obr. 8: Schéma organizace LtxA toxinu.

2.4 *Actinobacillus pleuropneumoniae*-RTX-toxin I (ApxI) bakterie *Actinobacillus pleuropneumoniae*

ApxI je protein produkovaný gram-negativní bakterií *Actinobacillus pleuropneumoniae* sérotypy 1, 5, 9, 10, a 11⁹³ způsobující velmi nakažlivou pleuropneumonii prasete domácího, která se projevuje těžkým zápallem plic a pohrudnice způsobující velké ztráty ve výrobě vepřového masa⁹⁴.

ApxI má silnou hemolytickou aktivitu a jeho cytotoxicita se nejvíce projevuje v prasečích alveolárních makrofázích a neutrofilních monocytech, na které se váže rozpoznáním LFA-1. ApxI má 110 kDa⁹⁵. Organizace domén tohoto proteinu je velmi podobná LtxA (**Obr. 9**).

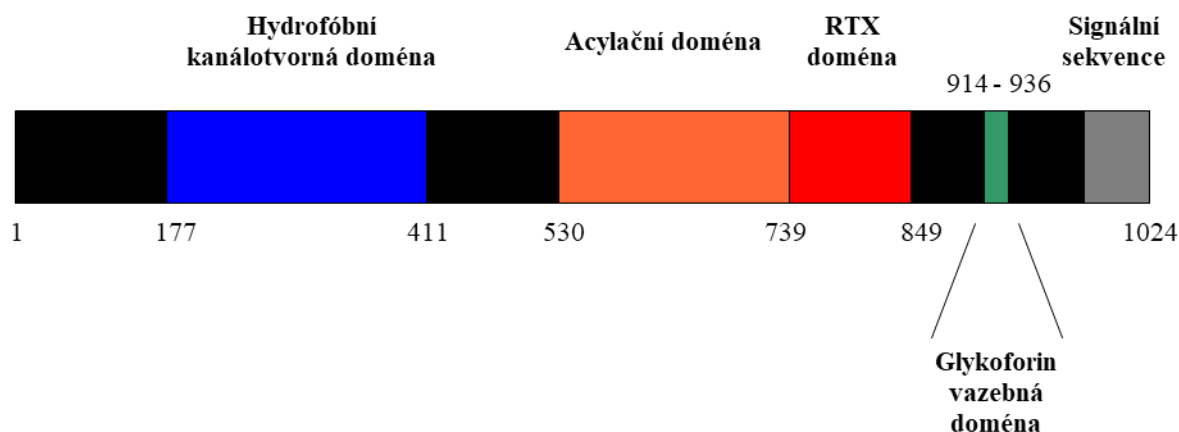


Obr. 9: Schéma organizace ApxI toxinu.

2.5 Alfa-hemolysin (HlyA) bakterie *Escherichia coli*

Uropatogenní kmeny *E. coli* způsobující zánět močového traktu produkují HlyA jako jeden ze svých hlavních virulentních faktorů.

HlyA svou kanálotvornou aktivitou způsobuje lyzi erytrocytů. HlyA má silnou hemolytickou aktivitu. HlyA má 110 kDa. Organizace domén tohoto proteinu je velmi podobná LtxA a ApxI (**Obr. 10**)⁹⁶.



Obr. 10: Schéma organizace HlyA toxinu.

3 Materiál a metody

3.1 Chemikálie, materiál a přístrojové vybavení

3.1.1 Seznam použitých chemikálií

β -merkaptoethanol, Calbiochem, Německo.

Akrylamid, Serva, Německo.

Bacto-tryptone, Oxoid, Velká Británie.

Bakteriologický agar, Oxoid, Velká Británie.

Bromfenolová modř, Sigma Aldrich, USA

Coomassie Brilliant Blue R-250, Serva, Německo.

Dihydrogenfosforečnan draselný, Sigma-Aldrich, USA.

Dihydrogenfosforečnan sodný (dihydrát), Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Dodecylsulfát sodný (SDS), Serva, Německo.

Ethanol, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), Serva, Německo.

Fosfatidylcholin sojový SPC S IIa, Sigma-Aldrich, USA.

Glukosa (25 % roztok), Přípravna médií, ČR.

Glutathion, Sigma-Aldrich, USA.

Glutathion-Agarosa, Sigma-Aldrich, USA.

Glycerol, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Glycin, Serva, Heidelberg, Německo

Hovězí sérový albumin Albumin Fraktion V (BSA), Carl Roth, Německo.

Hydrogenfosforečnan disodný (dodekahydrát), Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Chlorid amonný, Sigma-Aldrich, USA.

Chlorid draselný, Lachema, ČR.

Chlorid sodný, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Chlorid vápenatý, Lachema, ČR.

Chloroform, Lachema, ČR.

Isopropanol, Lachema, Neratovice, Česká republika.

Izopropyl β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG), Sigma-Aldrich, USA.

Kanamycin, Sigma-Aldrich, USA.

Kvasničný extrakt, Oxoid, Anglie.

Kyselina octová, Lach-Ner, s. r. o., ČR.
Kyselina orthofosforečná 85 %, Lach-Ner, s. r. o., ČR.
L-glutamin (3 % roztok), Přípravna médií, ČR.
Methanol, Lach-Ner, s. r. o., ČR.
Močovina, Merck, Německo.
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), Serva, Německo.
N,N'-methylen-bisakrylamid, Serva, Německo.
Ni-Sepharosa, Sigma-Aldrich, USA.
Octyl-beta-D-glucopyranosid, Sigma-Aldrich, USA.
Persulfát amonný (APS), Serva, Německo.
Proteinový standard PageRuler Stained Protein Ladder, Fermentas International Inc., Kanada.
Proteinový standard PageRuler Unstained Protein Ladder, Fermentas International Inc., Kanada.
Pyruvát (1,1 % roztok), Přípravna médií, ČR.
Síran sodný, Sigma-Aldrich, USA.
Thiamin hydrochlorid, Calbiochem, Německo.
Tris Hydrochlorid (Tris-HCl), Serva, Německo.

Všechny použité chemikálie dosahovaly analytické čistoty.

3.1.2 Přístrojové vybavení

Äkta prime plus, GE Healthcare Life Sciences, USA.
Centricon Amicon MW 10000 cut-off, Millipore, Billerica, USA.
Centrifuga Eppendorf 5415 R, Eppendorf AG, Německo.
Centrifuga MiniSpin[®], Eppendorf AG, Německo.
Centrifuga Sorvall RC26 Plus, Du Pont Instruments, USA.
Digitální váhy HF-2000G, A&D Weighing, USA.
Digitální váhy, Mettler, Bonn, Německo.
Elektroforéza Mini-PROTEAN II, Bio-Rad, USA.
Gryphon crystallization robot (Art Robbins, USA)
Mrazicí box (-20 °C), Zanussi, Řím, Itálie.
Mrazicí box (-80 °C), Jouan, Paříž, Francie.
pH-metr, inoLab Level 1, WTW, Německo.
Předvážky Nagma, OWA Labor, Berlin, Německo.
rentgenový difraktometr Rigaku („RUH-2R rotating anode x-ray generator, Raxis IV image

plate system/Osmic optics and inverted phi axis goniometer“), Tokyo, Japonsko
 Spektrofotometr SECOMAM S.250I+, ALC-SECOMAM, Francie.
 Superdex 200 10/300 GL kolona, GE Healthcare Life Sciences, USA.
 Stereomikroskop Olympus SZX 16, Japonsko
 Smyčky na lovení krystalů různé velikosti – Mounted Round Litholoops, Molecular dimensions, USA
 Synchrotronu Bessy-MX CCD kamerou Roentec X-Flash, Roentec X-Flash na stanovišti BL - 14.1, nebo CCD kamerou Roentec X-Flash, MX-225 na stanovišti BL – 14.2 v Helmholtz-Zentrum Berlín (Německo).
 Termostatovaná vodní lázeň typ U7C, VEB MLW, Mnichov, Německo.
 Termostatovaná vodní lázeň typ UH8, VEB MLW, Mnichov, Německo.
 TSK G2000SWG kolona, Tosoh Bioscience, USA
 Ultrasonikátor S3000, Misonix, USA.
 Vortex MS2 minishaker, IKA-Works, Inc., USA.
 Zdroj pro elektroforézu PowerPac, Basic Power Supply, Bio-Rad, USA.

3.1.3 Roztoky a pufr

30 % roztok akrylamidu pro SDS-PAGE elektroforézu:

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

Barvicí roztok pro SDS-PAGE elektroforézu:

Methanol	225 ml
Voda	225 ml
Kyselina octová	50 ml
Coomassie Brilliant Blue R-250	0,5 g

Barvicí roztok pro western blotting

Methanol	45 % v/v
Kyselina octová	10 % v/v
Coomassie Brilliant Blue R-250	0,2 % w/v
Voda	doplnit do požadovaných koncentrací

Blotovací pufr: pH 8,3

Tris	2,5 mM
Glycin	19,2mM
SDS	0,01%
methanol	20 %

Činidlo Bradfordové:

Coomassie Brilliant Blue R-250	0,01 % (w/v)
Ethanol	4,7 % (v/v)
H ₃ PO ₄	8,7 % (v/v)

Komerční krystalizační sady pro screening krystalizačních podmínek:

JCSG, Core Suite I-IV, Qiagen, Německo

MIDAS, Molecular Dimensions, UK

MORPHEUS, Molecular Dimensions, UK

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE elektroforézu:

Methanol	25 % v/v ml
Kyselina octová	10 % v/v ml
Voda	doplnit do požadovaných koncentrací

Odbarvovací roztok pro western blot

Methanol	45 % v/v
Kyselina octová	10 % v/v
Voda	doplnit do požadovaných koncentrací

PBS: pH 7,4

NaCl	138 mM
KCl	3 mM
Na ₂ HPO ₄	12 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM

Rozdělovací gel pro SDS-PAGE elektroforézu 12,5 %: pH 8,8 zkontrolovat

30 % roztok akrylamidu	1.33 ml
Destilovaná voda	1.72 ml

1 M Tris-HCl pufr (pH 8,8)	1,87 ml
10 % SDS	50 μ l
25 % APS	12,5 μ l
TEMED	12,5 μ l
TC pufr:	
Tris-HCl pH 7,4	50 mM
CaCl ₂	10 mM
TN pufr:	
Tris-HCl pH 8	50 mM
NaCl	150 mM
TNC1 pufr: pH 7,4	
Tris-HCl	50 mM
NaCl	150 mM
CaCl ₂	10 mM
TNC2 pufr: pH 7,4	
Tris-HCl	5 mM
NaCl	150 mM
CaCl ₂	10 mM
TNI ₄₀ pufr: pH 7,4	
Tris-HCl	50 mM
NaCl	150 mM
imidazol	40 mM
Tris-glycinový pufr (pH 8,3)	
Tris	25 mM
Glycin	250 mM
SDS	0,1 % (w/v)
TNI ₂₅₀ pufr: pH 7,4	
Tris-HCl	50 mM

NaCl	150 mM
imidazol	250 mM

TU pufr: pH 8,0

Tris-HCl	50 mM
Močovina	8 M

TUC pufr: pH 8,0

Tris-HCl	50 mM
Močovina	8 M
CaCl ₂	0,2 mM

TUI₄₀ pufr: pH 8,0

Tris-HCl	50 mM
Močovina	8 M
imidazol	40 mM

TUI₂₅₀ pufr: pH 8,0

Tris-HCl	50 mM
Močovina	8 M
imidazol	250 mM

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE: pH 6,8

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

Před použitím se přidá 2-merkaptoethanol do výsledné koncentrace 10 % (v/v).

Zaostřovací gel pro SDS-PAGE elektroforézu 5 %: pH 6,8

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

3.1.4 Kultivační média

3.1.4.1 Tekutá kultivační média pro bakteriální kultury

LB médium (Luria-Bertani médium):

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

pH se upraví na 7,0 pomocí 5 M NaOH.

Sterilace autoklávem (0,12 MPa, 120 °C, 20 minut).

Po sterilizaci a vychladnutí se k médiu přidá kanamycin do výsledné koncentrace 60 µg/ml.

MDO médium:

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

pH se upraví na 7,0 pomocí 5 M NaOH.

Sterilace autoklávem (0,12 MPa, 120 °C, 20 minut)

Po sterilizaci a vychladnutí se k médiu přidá kanamycin do výsledné koncentrace 60 µg/ml.

3.1.4.2 Tuhá kultivační média pro bakteriální kultury

LB půda (Luria-Bertani médium) pH 7,2:

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

pH se upraví na 7,0 pomocí 5 M NaOH.

Před sterilizací se do média přidá 18 g/l bakteriologického agaru. Po sterilaci se médium vychladí na teplotu přibližně 50 °C, přidá se kanamycin do výsledné koncentrace 60 µg/ml, a

po zamíchání se takto připravené médium používá na přípravu agarových ploten, které se uchovávají při 4 °C.

3.1.5 Bakteriální kmeny

Kmen *Escherichia coli* BL21 λ (DE3).

Kmen *Escherichia coli* Arctic Express (ArcticExpress Competent Cells)

3.1.6 Použité proteinové konstrukty

ApxI (722-982) = RTX ApxI – úsek ApxI 261 AK, RTX doména.

CyaA (1528-1681) = CyaA Blok 5 – úsek CyaA 154 AK, část RTX domény.

CyaA (1371-1681) = CyaA Blok 4-5 – úsek CyaA 311 AK, část RTX domény.

HlyA (733-976) = RTX HlyA – úsek HlyA 244 AK, RTX doména.

LtxA (722-979) = RTX LtxA – úsek LtxA 258 AK, RTX doména.

TEV proteáza

Struktura proteinových konstruktů:

His-tag + GST-tag + štěpící místo pro TEV proteázu + proteinový konstrukt

3.2 Metody a pracovní postupy

Plazmidy s proteinovými konstrukty vytvořil Ladislav Bumba a Nela Klímová (CyaA blok 4-5) na MBÚ AVČR, kde mi také poskytli připravené superkompetentní buňky *E. Coli*.

3.2.1 Produkce a purifikace proteinových konstruktů

3.2.1.1 Transformace plazmidové DNA do kompetentních buněk

K 50 μ l suspenze superkompetentních buněk (kap. 3.1.5) byl přidán 1 μ l plazmidové DNA pET42b²⁷ s příslušnou proteinovou DNA ze zásobních roztoků. Obsah byl šetrně, ale pečlivě zamíchán. Plazmid s vloženým genem pro proteinový konstrukt nesl gen *kanR* pro aminoglykozid fosfotransferázu zajišťující nositeli rezistenci ke kanamycinu, který byl použit jako selekční marker. Směs byla inkubována 10 minut při 4 °C, následně přenesena na 5 minut do vodní lázně o teplotě 37 °C a poté ochlazená po dobu 2 minut na ledu. Po přidání 1 ml předehřátého tekutého LB média (kap. 3.1.4.1) byla kultura inkubována 60 minut při 37 °C. Během této doby se plazmid uvnitř transformovaných buněk replikoval a došlo k produkci určitého množství β -laktamázy, která spustila syntézu žádaného proteinového konstruktu. V závěru celého procesu bylo vyseto 50–200 μ l suspenze na tuhé LB médium s kanamycinem (kap.3.1.4.2), ke kterému transformované buňky nesly rezistenci. Buňky byly inkubovány ve 37 °C, 12–16 hodin.

3.2.1.2 Produkce toxinu v 500 ml kulturách

2-3 bakteriální kolonie po transformaci (kap. 3.2.1.1) byly přeneseny do 50 ml tekutého MDO média obsahujícího kanamycin (kap. 3.1.4.1) a dále byly kultivovány za stálého třepání 12-16 hodin při 37 °C. Následně bylo odebráno 5-10 ml (podle nárstu noční kultury) pro zaočkování 500 ml čerstvého MDO média s kanamycinem. Bakteriální kultura byla inkubována za nepřetržitého třepání při teplotě 37 °C do optické denzity $OD_{600\text{ nm}} = 0,6$, kdy došlo k indukci produkce proteinu přidavkem IPTG o výsledné koncentraci 1 mM. Vzhledem k tomu, že geny kódující proteinové konstrukty byly pod kontrolou inducibilního *lac* promotoru. Produkce proteinu v kultuře probíhala za stálého třepání 4 hodiny při 37 °C. Kultivace bakterií byla ukončena prudkým ochlazením narostlé bakteriální kultury v lázni voda-led. Přítomnost a hrubý odhad množství příslušného proteinu byl zjištěn pomocí SDS-PAGE (kap. 3.2.2.1), pro kterou byl odebrán 1 ml narostlé bakteriální kultury, který byl dále centrifugován: 12 000 g, pokojová teplota, 1 minuta. Po odstranění supernatantu byl pelet buněk resuspendován ve 200 µl TUC pufru). Následně bylo odebráno 20 µl tohoto roztoku na SDS-PAGE gel.

Po kultivaci byla narostlá bakteriální kultura byla centrifugována 4000 g, 4 °C, 20 minut. Pelet byl promyt resuspendací v TNC1 pufru a opětovnou centrifugací 4000 g, 4 °C, 20 minut a zamrazen v -20 °C.

3.2.1.3 Příprava extraktu proteinových konstruktů

Pelet buněk (z kap. 3.2.1.2) byl rozmrazen, resuspendován v 40 ml TNC1 pufru a sonikován: 2 minut, 35 W, 0 °C, délka pulzu 15 s, 60 s pauza na chlazení. Po sonikaci byly zbývající celistvé buňky a velké buněčné zbytky odstraněny centrifugací: 20000 g, 4 °C, 20 minut. Supernatant byl převeden do nových zkumavek a byl z něj odebrán vzorek na SDS-PAGE (kap. 3.2.2.1).

3.2.1.4 Příprava močovínového extraktu proteinového konstruktu RTX ApXI (722-982)

Pelet buněk (z kap. 3.2.1.2) byl resuspendován v 10 ml TNC1 pufru a sonikován: 2 minut, 35 W, 0 °C, délka pulzu 15 s, 60 s pauza na chlazení. Po sonikaci byly zbývající celistvé buňky odstraněny centrifugací: 4000 g, 4 °C, 5 minut. Supernatant byl přenesen do nové centrifugační zkumavky a centrifugován 18000 g, 4 °C, 30 minut. Protein přítomný v inkluzních těliscích bakterií se poté nacházel v peletu. Supernatant byl odstraněn a membrány buněk byly odstraňovány opatrným odmýváním sedimentu v TU pufru. Inkluze s proteinem byly poté resuspendovány v deionizované vodě a celý obsah zkumavky byl centrifugován: 18000 g, 4 °C, 10 minut. Supernatant byl znovu odstraněn a k vytvořenému peletu bylo přidáno 4,8 g krystalické močoviny a 6 ml 50 mM roztoku Tris-HCl (pH 8,0). Pelet byl jemně promícháván pomalou inverzí po dobu 45 minut, aby došlo k úplnému rozpuštění močoviny na výslednou koncentraci 8 M. Získaný roztok byl centrifugován (18000 g, 4 °C, 30 minut) a supernatant (močovínový extrakt) obsahující denaturovaný RTX ApXI (722-982) byl převeden do nových zkumavek a uchováván při teplotě -20 °C. Pro analýzu přítomnosti a množství

toxinu v močovinovém extraktu byly použity metody SDS-PAGE (kap. 3.2.2.1) a stanovení koncentrace podle Bradfordové (kap. 3.2.2.2).

3.2.1.5 Purifikace proteinových konstruktů afinitní chromatografií na Glutathion-Sepharose – Purifikace I

Chromatografická kolona byla naplněna 5 ml Glutathion-Sepharosy a promyta destilovanou vodou, aby došlo k odstranění ethanolu, ve kterém byla matrice uchovávána. Poté byla ekvilibrována TNC1 pufrem (cca 100 ml). Supernatant (z kap. 3.2.1.3) byl přenesen na kolonu s Glutathion-Sepharosou, kde došlo k zachycení proteinového konstruktů pomocí GST-kotvy. Dále byla kolona několikrát promyta TNC1 pufrem. Proteinový konstrukt byl eluován roztokem redukovaného glutathionu (3 mg/ml). Během eluce bylo orientační množství proteinu stanoveno metodou podle Bradfordové (kap. 3.2.2.2). Přítomnost a čistota získaného proteinového konstruktů z Glutathion-Sepharosy byla poté zjištěna pomocí SDS-PAGE (kap. 3.2.2.1). Na závěr byla kolona s Glutathion-Sepharosou naplněna PBS s 0,1 % azidem sodným.

3.2.1.6 Odstranění Glutathionu dialýzou a štěpení proteinového konstruktů TEV proteázou

Po prvním kroku purifikace (kap. 3.2.1.6) byl vzorek proteinového konstruktů uzavřen v dialyzačním střívkem (cut-off 3000 Da) s TEV proteázou, která odštěpila GST-kotvu. Poměr hmotnostní koncentrace TEV proteázy ku hmotnostní koncentraci proteinového konstruktů byl zvolen 1:20. Poměr objemu dialyzovaného vzorku ku TN dialyzačnímu pufru byl zvolen 1:2000. Dialýza probíhala za stálého míchání po dobu 12-18 hodin při 4 °C. Poté byl obsah dialyzačního střívka centrifugován: 4000 g, 10 min, 4 °C. Přítomnost a kvalita naštěpení proteinového konstruktů TEV proteázou byla zjištěna pomocí SDS-PAGE (kap. 3.2.2.1).

3.2.1.7 Purifikace proteinových konstruktů afinitní chromatografií na Ni-Sepharose – Purifikace IIa

Chromatografická kolona byla naplněna 5 ml Ni-Sepharosy a promyta deionizovanou vodou, aby došlo k odstranění ethanolu, ve kterém byla matrice uchovávána. Poté byla ekvilibrována přibližně 50 ml TN/TU pufrem (v případě močovinového extraktu). Supernatant z kap. 3.2.1.6; 3.2.1.4 byl nanesen na kolonu. V koloně byl zachytávána GST-kotva přes His-tag a proteinový konstrukt byl vymýván TNI₄₀/TNU₄₀ pufrem (v případě močovinového extraktu) do zkumavek. Orientační množství proteinu v jednotlivých zkumavkách bylo stanoveno metodou podle Bradfordové (kap. 3.2.2.2). Po dostatečném promytí TNI₄₀/TNU₄₀ pufrem byla kolona promyta 200 ml TNI₂₅₀/TNU₂₅₀ pufru. Přítomnost a čistota získaného proteinového konstruktů z Ni-Sepharosy byla zjištěna pomocí SDS-PAGE (kap. 3.2.2.1). Nejlepší eluční frakce byly smíchány a zahuštěny na centriconu Amicon (10000 Da cut-off). Konečné stanovení koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích bylo provedeno metodou podle Bradfordové (kap. 3.2.2.2).

V případě močovinového extraktu jsem pokračovala dialýzou a štěpením TEV proteázou (kap. 3.2.1.6) a opakovala jsem purifikaci na Ni-Sepharose s příslušnými TU pufrů pro odstranění GST kotvy přes His-tag.

3.2.1.8 Purifikace precipitací GST – Purifikace IIb

Ke konci experimentální práce na doktorátu jsem místo purifikace na koloně s Ni-Sepharose kap. 3.2.1.7, využila tepelné odolnosti malých RTX domén a během purifikace RTX LtxA, jsem použila precipitaci GST při 70 °C po dobu 30 minut. Následná centrifugace: 4000 g, 10 min, 4 °C odstranila vyprecipitované GST a kvalita čistoty získaného proteinu byla srovnatelná s použitím afinitní chromatografie na koloně s Ni-Sepharose.

3.2.1.9 Gelová filtrace proteinových konstruktů

Gelová filtrace byla prováděna na aparatuře Äkta prime plus za použití kolon TSK G2000SWG (CyaA blok 5) nebo Superdex 200 10/300 GL (ostatní proteinové konstrukty) při pokojové teplotě.

Nejprve se kolona equilibrovala TNC2 pufrům, dokud se vodivost neustálila na hodnotě odpovídající vodivosti pufru. Poté byl nanesen zakonzentrovaný vzorek proteinového konstruktů o koncentraci maximálně 10 mg/ml a objemu 2 ml (TSK G2000SWG) nebo 0,5 ml (Superdex 200 10/300 GL). Průtok byl nastaven na 2 ml/min (TSK G2000SWG) nebo 0,5 ml/min (Superdex 200 10/300 GL). Poté byl vzorek nanesen na kolonu. Podle změn absorbance při 220 nm se odebíraly relevantní frakce filtrovaného proteinového konstruktů. Přítomnost a čistota získaného proteinového konstruktů z gelové filtrace byla zjištěna pomocí SDS-PAGE (kap. 3.2.2.1). Relevantní eluční frakce byly smíchány. Konečné stanovení koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích bylo provedeno metodou podle Bradfordové (kap. 3.2.2.2). Na závěr byly kolony promývány 20 % v/v roztokem ethanolu, dokud se vodivost neustálila na hodnotě blízké 0.

3.2.2 Stanovení vlastností a množství proteinových konstruktů

3.2.2.1 SDS-polyakrylamid elektroforéza

Ke 10 µl proteinu bylo přidáno 5 µl vzorkového pufru určeného pro elektroforézu v SDS-polyakrylamidovém gelu. Takto připravené vzorky byly nanесeny na gel, sestávající z horního 5 % zaostřovacího gelu a ze spodního 12,5 % rozdělovacího gelu. Po proběhnutí elektroforézy (8 V/cm pro zaostřovací gel a 15 V/cm pro rozdělovací gel) v Tris-glycinovém pufru (pH 8,3), byl odstraněn zaostřovací gel a rozdělené proteiny byly vizualizovány barvicím roztokem pro SDS-PAGE s Coomassie Brilliant blue R-250 (mírné třepání, 20 °C, 1 hodina). Poté byl rozdělovací gel odbarven v odbarvovacím roztoku pro SDS-PAGE (mírné třepání, 20 °C, 1 hodina), promyt destilovanou vodou a vysušen v celofánové fólii. Pro porovnání molekulové hmotnosti rozdělených proteinů byl použit standard molekulových hmotností (PageRuler Unstained Protein Ladder).

3.2.2.2 Stanovení koncentrace proteinů

Ke stanovení koncentrace proteinů ve vzorku bylo použito metody podle Bradfordové⁹⁷. Nejdříve byla v rozmezí 10-100 µg/ml připravena série ředění BSA, který byl použit jako kalibrační standard. Poté bylo ke 100 µl ředěných standardů, 100 µl vzorků ředěných podle odhadované koncentrace a 100 µl samotného pufru (referenční standard) přidáno 900 µl

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 sestrojena kalibrační křivka, z níž byla po korekci na ředění odvozena koncentrace proteinu ve vzorku.

3.2.2.3 Western blotting RTX LtxA

Proteiny byly separovány SDS-PAGE (kap. 3.2.2.1). Jako standard molekulových hmotností byl použit PageRuler Stained Protein Ladder. Po dokončení separace byly přeneseny na polyvinylidendifluoridovou (PVDF) membránu (4 x 5 cm na 4 jamky SDS-PAGE). PVDF membrána byla nejprve aktivována ve 100 % methanolu. Poté byla omyta destilovanou vodou a ponechána v blotovacím pufri. Do blotovacího pufri byl také přenesen gel z SDS-PAGE a byly v něm navlhčeny 2 filtrační papíry odpovídající velikosti PVDF membrány. Do blotovací aparatury byly na anodu vloženy součásti v tomto pořadí:

1. filtrační papír,
2. PVDF membrána,
3. SDS-PAGE gel,
4. filtrační papír.

Byly odstraněny bublinky mezi PVDF membránou a gelem. Všechny vrstvy k sobě byly pevně přitlačeny a aparatura byla uzavřena katodovou částí. K přenosu RTX LtxA z SDS-PAGE gelu na PVDF membránu bylo použito 1 mA/cm^2 ($0,3 \text{ W/cm}^2$). Po přenesení RTX LtxA na PVDF membránu bylo provedeno barvení barvicím roztokem na western blotting do zmodrání proteinových proužků. Následoval oplach destilovanou vodou a odbarvování. Odbarvovalo se 3 x 16 ml odbarvovacím roztokem na western blotting (mírné třepání, $20 \text{ }^\circ\text{C}$) do odbarvení pozadí. Proužek obsahující RTX LtxA byl vystřižen a poslán na N-koncové sekvenování popsané v následující kapitole.

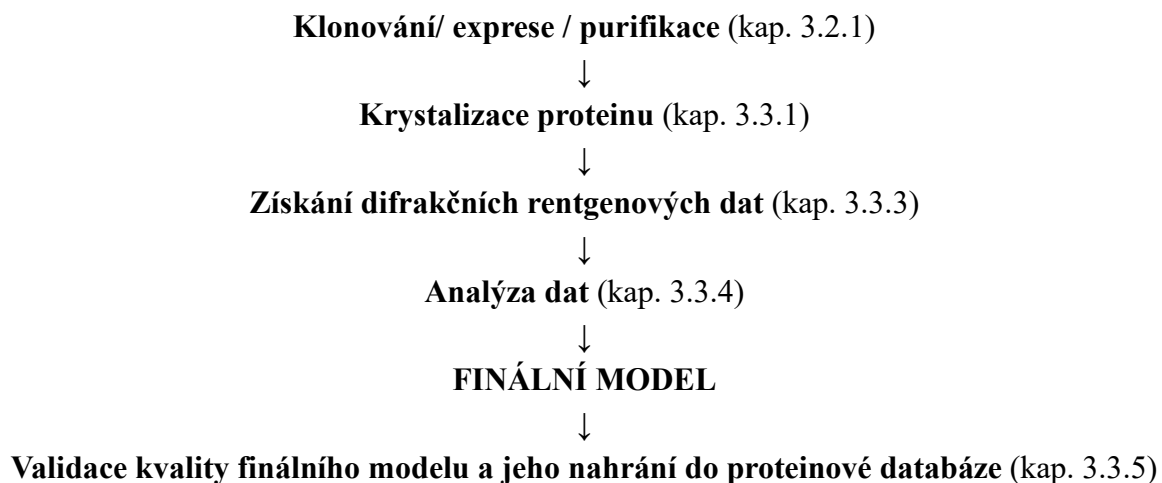
3.2.2.4 Sekvence RTX LtxA

Stanovení N-terminální sekvence RTX LtxA provedla Doc. RNDr. Helena Ryšlavá CSc. z katedry Biochemie, PřF UK metodou automatického Edmanova odbourávání na sekvenátoru proteinů PROCISE 491 (Applied Biosystems, USA).

Princip metody: vzorek RTX LtxA byl imobilizován na PVDF membráně metodou Western blot (kap. 3.2.2.3). Vzorek byl umístěn do reakční nádoby přístroje, a podroben opakovaným reakcím Edmanova odbourávání: reakce vzorku s fenylisothiokyanátem proběhla v alkalickém prostředí aminu, který byl poté odpařen, a proběhlo odštěpení N-koncové aminokyseliny v kyselém prostředí bezvodé kyseliny trifluoroctové. Uvolněný ATZ (anilin thiazolinon (z angl. AnilinoThiaZolinone)) derivát aminokyseliny byl extrahován nevodnými solventy (ethylacetát, 1-chlorobutan), přenesen do konverzní nádoby, a po odpaření rozpouštědel proběhla přeměna na stabilní PTH (fenylthiohydantoin (z angl. PhenylThioHydantoin)) derivát aminokyseliny. Ten byl poté identifikován pomocí HPLC systému.

3.3 Proteinová krystalografie proteinových konstruktů

Základní schéma získání struktury pomocí proteinové krystalografie:



3.3.1 Krystalizace proteinových konstruktů

Pro krystalizaci jsem použila konstrukty vyprodukované podle kap. Produkce a purifikace proteinových konstruktů. K nasazení proteinů na krystalizaci docházelo v 0-2 dnech po gelové filtraci. Proteiny byly zakoncentrovány na koncentraci 2,5-14 mg/ml podle jejich vlastností a množství a uchovávány při 4 °C.

K získání proteinových krystalů byla použita technika difúze par ("vapor diffusion"). Principem techniky je kombinace difúze par s použitím směsí precipitantů. Pro vznik krystalu musí dojít k přesycení kapky proteinového roztoku s precipitantem, aby mohlo vzniknout optimální množství nukleárních jader. Postupnou difúzí par mezi kapkou a rezervoárem, který obsahuje samotný precipitant v mnohanásobně větším objemu dochází v ideálním případě k růstu krystalu. Difúze probíhá až do ustanovení rovnovážného stavu mezi kapkou a rezervoárem, kdy růst krystalu končí. Optimální nukleace a růst krystalu závisí na mnoha faktorech např. na koncentraci a rozpustnosti proteinu, koncentraci precipitačního činidla a na mnoha dalších fyzikálně-chemických faktorech (teplota, tlak, pH, ...). Tuto techniku jsem používala v uspořádání kapek visících ("hanging drops") a sedících ("sitting drops").

3.3.1.1 Nasazení proteinových konstruktů na screening podmínek

Všechny získané proteinové konstrukty byly nasazeny na komerční screeny JCSG Core Suites I – IV Core Suite⁹⁸ (Qiagen, USA). Na komerční screeny Morpheus⁹⁹ a Midas¹⁰⁰ (Molecular Dimensions, USA) byly nasazené všechny získané proteinové konstrukty mimo CyaA blok 5 a RTX HlyA. Každý screen obsahuje 96 různých precipitantů. Kapky byly nasazeny na krystalizační destičky INTELLI-PLATE 96-3 Low Volume Reservoir (Art Robbins Instruments, USA) pomocí Gryphon crystallization robot (Art Robbins Instruments, USA). Tyto destičky jsou určeny pro krystalizaci proteinu pomocí difúze par v sedících kapkách. Kapky o celkovém objemu 0,3 µl byly ekvilibrovány vůči 70 µl precipitantu při

18 °C. Podmínky nasazení pro jednotlivé konstrukty jsou shrnuty v Tab. 2.

Proteinový konstrukt	Koncentrace konstruktů (mg/ml)	Použité poměry objemu (konstrukt : precipitant)	Složení pufru proteinového konstruktů
CyaA Blok 5	7	2:1	Tris-HCl 5 mM
		1:1	CaCl ₂ 10 mM
		1:2	NaCl 150 mM
CyaA Blok 4-5 screening 1	5	2:1	Tris-HCl 5 mM
		1:1	CaCl ₂ 10 mM
		1:2	NaCl 150 mM
CyaA Blok 4-5 screening 2	9,3	2:1	Tris-HCl 5 mM
		1:1	CaCl ₂ 10 mM
		1:2	NaCl 150 mM
RTX LtxA	6,5	1:1	Tris-HCl 5 mM CaCl ₂ 5 mM
		1:2	NaCl 150 mM
RTX Hly A	2,5	3:2	Tris-HCl 20 mM CaCl ₂ 2 mM NaCl 150 mM Octyl-beta-D-glucopyranosid 0,2%
RTX ApxI	5	2:1	Tris-HCl 5 mM
		1:1	CaCl ₂ 10 mM
		1:2	NaCl 150 mM

Tab. 2: Podmínky nasazení proteinových konstruktů ke screeningu krystalizačních podmínek.

3.3.1.2 Krystalizace proteinových konstruktů ve vybraných podmínkách ve visících kapkách

Nasazené krystalizační screeny byly pravidelně kontrolovány. Nakonec byly vybrány precipitanty, v nichž se objevily krystaly. Většina z nich nedosáhla velikosti (alespoň 100 μm na nejdělsí hraně), která by umožnila získat difrakční data potřebná k vyřešení struktury proteinových konstruktů. Přistoupila jsem tedy k pěstování krystalů ve větším objemu, různých koncentracích proteinů a v některých případech k dalším optimalizacím krystalizačních podmínek za účelem získání větších krystalů.

Pro krystalizaci proteinu pomocí difúze par ve visících kapkách byly použity 24-jamkové destičky (VDXm plate with sealant, Hampton research, USA) se silikonovou vazelínou na horním okraji jamky, který slouží k připevnění sklíčka (Circular cover slides r = 22 mm, Jena

Bionescence, Německo), na jehož vnitřní straně je kapka/y se směsí proteinového roztoku a precipitantu.

Precipitanty byly namíchány z filtrovaných roztoků špičkami s filtrem (Eppendorf, Německo). Proteinové konstrukty uskladněné při 4 °C 1-120 dní byly před nasazením centrifugovány 12100 g 10 minut pro odstranění případných precipitátů. Proteinový konstrukt byl napipetován špičkami s nesmáčivým povrchem (low retention tips, Eppendorf, Německo) na sklíčko do kapky precipitantu a dostatečně promíchán pomocí pipety. Kapky o celkovém objemu 3 μ l byly ekvilibrovány vůči precipitantu o objemu 500 μ l při 18 °C. Vybrané podmínky pro jednotlivé proteinové produkty a počet kapek na sklíčko jsou popsány ve výsledcích.

3.3.1.3 Optimalizace krystalizace ve visících kapkách

Během krystalizace ve visících kapkách bylo přistoupeno k optimalizace krystalizace několika způsoby:

1. Snižování koncentrace některých složek precipitantu v matečním roztoku. Mělo tím dojít ke zpomalení difúze par a pomalejšímu růstu krystalů, které ovšem měly mít pravidelnější strukturu.

2. „Microseeding“ - očkovací technika, kdy se do nasazených kapek přidávají malé krystalky, získané např. rozdrčením předem získaného krystalu.

3.3.2 Příprava krystalů na rentgenovou analýzu

3.3.2.1 Získání kryopodmínky a lovení krystalu

Proteinové krystaly je před rentgenovou analýzou třeba zamrazit v tekutém dusíku. Tento postup zvyšuje jejich odolnost vůči radiačnímu poškození rentgenovým zářením a usnadňuje transport a skladování krystalů. Proteinové krystaly mají vysoký obsah vody. Jejich přímým zmražením by mohlo dojít k roztrhání struktury hexagonálními krystaly ledu. Při zmražení se tedy používají kryoprotektanty, které zpomalují nukleaci ledových krystalů a jejich působením tak vznikne amorfní fáze vody a na difrakčním obraze se neobjeví tzv. ledové kruhy, které negativně ovlivňují zpracování difrakčních dat.

Jako kryoprotektant byl použit glycerol. Jeho ideální koncentrace byla zjišťována na rentgenový difraktometr Rigaku, kde se získával difrakční obraz v dusíku zmraženého matečního roztoku s různými koncentracemi glycerolu v nylonové smyčce ($r = 100 \mu\text{m}$). Pro jednotlivé krystalizační podmínky byla vybrána nejnížší možná koncentrace glycerolu, která zabránila vzniku tzv. ledových kruhů na difrakčním obrazi.

Krystaly byly loveny nylonovými smyčkami, jejichž průměr přibližně odpovídal velikosti hrany krystalu. Krystal byl po zachycení do smyčky přenesen do matečního roztoku s glycerolem, kde byl ponechán několik vteřin. Poté byl znovu zachycen do smyčky a zmražen v plastové vialce s tekutým dusíkem. Zmražený krystal byl uchováván v tekutém dusíku až do měření na synchrotronu.

3.3.3 Rentgenová analýza

Všechna difrakční data byla získána z jednotlivých krystalů na synchrotronu Bessy-MX CCD kamerou Roentec X-Flash, Roentec X-Flash na stanovišti BL - 14.1, nebo CCD kamerou Roentec X-Flash, MX-225 na stanovišti BL – 14.2 v Helmholtz-Zentrum Berlín (Německo). Během měření byl krystal pod proudem par dusíku (-183,15 °C), aby nedošlo k jeho rozmrazení. Indexace difrakcí difraktogramů snímaných v orientaci a 0° a 90° $\Delta\varphi$ podle osy kolmé na rentgenové paprsky, pro získání optimální strategie pro získání datasetu byla vyhodnocována pomocí iMOSFLM^{101,102}.

3.3.4 Zpracování dat z rentgenové analýzy

Zpracování dat z rentgenové analýzy a tvorba modelu proteinu vytvořeného na základě dat je několikastupňový proces. Reflexe ze všech difraktogramů jsou indexovány. Počítá se Laueho grupa. Integrují a škálují se intenzity reflexí a určuje se prostorová grupa. Pro tuto část zpracování jsem použila balíček programů XDSAPP¹⁰³.

3.3.4.1 Řešení fázového problému

Fázový problém struktur proteinových konstruktů, které úspěšně krystalizovaly, byl vyřešen molekulárním nahrazením MR (angl. Molecular Replacement) v programu Phaser¹⁰⁴, který je součástí programového balíku CCP4^{105,106,107} (z angl. Collaborative Computational Project Number 4). Jednotlivé homologní modely použité pro molekulární nahrazení jsou uvedeny ve výsledcích.

3.3.4.2 Stavba modelu proteinové struktury a její rafinace

První model proteinových struktur byl postaven pomocí programu Arp/wArp¹⁰⁸. Na dostavění modelu, ruční zpřesňování pozic jednotlivých aminokyselin a ligandů byl použit program Coot 0.7¹⁰⁹. Po stavbě modelu a každém kole úprav byl model rafinován programem REFMAC 5.7.0029¹¹⁰. Vše se opakovalo, dokud nebyl získán model s nejvyšší možnou hodnotou R-faktoru, R_{free}-faktoru, RMSD od ideálních délek vazeb, úhlů a planarity. Tento finální model byl poté podroben strukturní analýze a validaci. Všechny programy uvedené v této kapitole jsou také součástí balíku krystalografických programů ze CCP4^{105,106,107}.

3.3.5 Validace finálního model

Některé geometrické faktory bylo možné ověřit přímo v programu Coot 0.7¹⁰⁹. Na celkovou validaci jednotlivých proteinových modelů byl použit webový program MolProbity¹¹¹ (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>). Finální ověření bylo provedeno validačním webovým programem wwPDB (z angl. **W**orld**W**ide **P**rotein **D**ata **B**ank) validation servers, který je součástí RCSB PDB (z angl. the **R**esearch **C**ollaboratory for **S**tructural **B**ioinformatics **P**rotein **D**ata **B**ank) databáze proteinových struktur¹¹². Finální proteinový model byl uložen do RCSB databáze, kde byl naposledy validován.

4 Výsledky

4.1 Krystalizace a řešení struktury vykrystalizovaných proteinových konstruktů

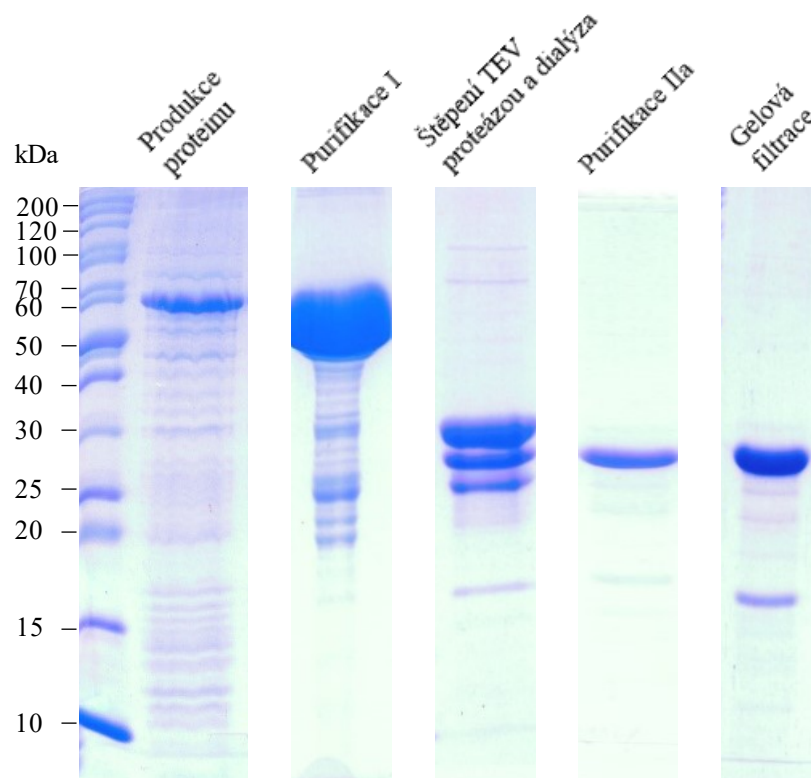
4.1.1 RTX HlyA (733-976)

4.1.1.1 Produkce RTX HlyA (733-976) a krystalizace

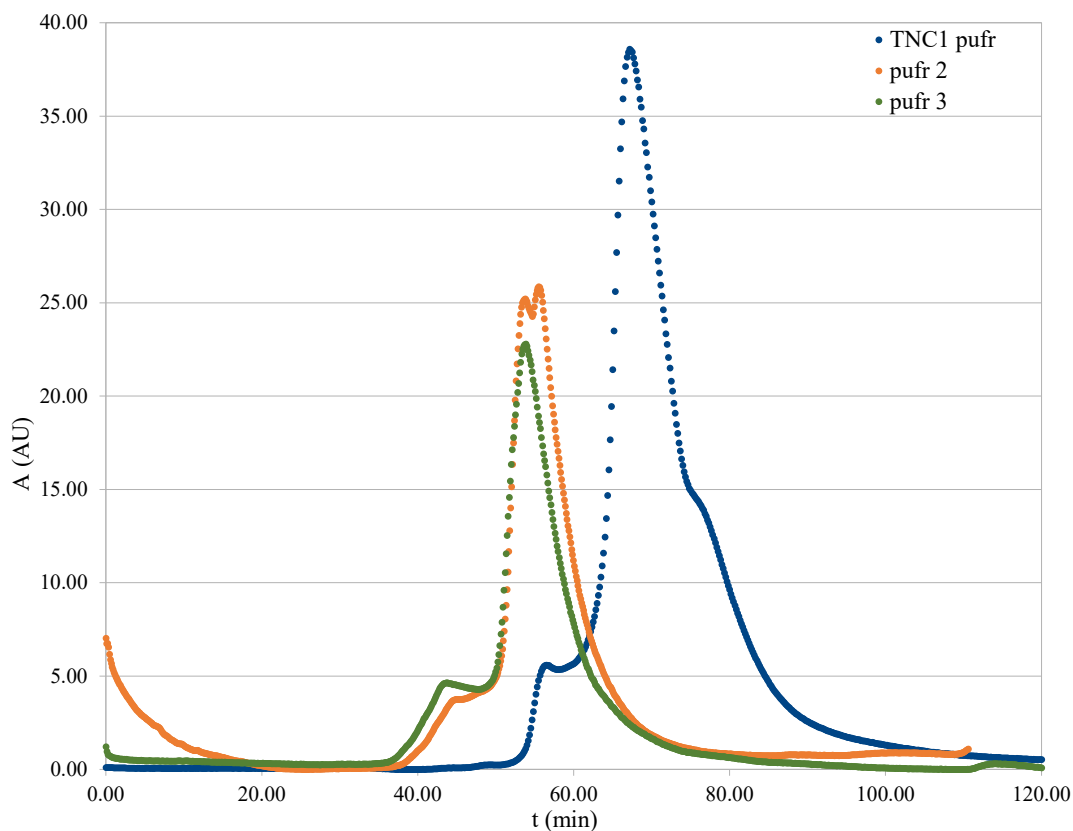
Produkce RTX domény HlyA (733-976) (RTX HlyA) probíhala podle postupu v metodách (kap. 3.2.1.1, 3.2.1.2). Purifikace probíhala podle kapitol 3.2.1.3, 3.2.1.5, 3.2.1.6, 3.2.1.7, 3.2.1.9 kontrolovaná SDS-PAGE (kap. 3.2.2.1) **Obr. 11**. Po afinitní chromatografii na Glutathion-Sepharose bylo množství konstruktů s GST 170 mg a po Ni-Sepharose bylo množství RTX HlyA 28,5 mg měřeno metodou podle Bradfordové (kap. 3.2.2.2). Bohužel se protein v pufru TNC1 i TNC2 srážel již při koncentraci kolem 1 mg/ml a nebylo ho možné dostatečně zakonzentrovat pro krystalizaci.

Byly tedy vybrány 3 pufrů, které měly zlepšit rozpustnost RTX HlyA. Složení pufru 1 bylo 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 20 mM NaCl, 2 mM CaCl₂. Složení pufru 2 bylo 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 5 % glycerol. Složení pufru 3 bylo 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 0,2 % octyl-β-D-glukopyranosid.

Proteinový konstrukt byl nejdříve zkoncentrován na centriconu Amicon (10000 Da cut-off) na nejvyšší možnou koncentraci tedy i nejnižší možný objem původního pufru TNC2 a poté byl 50 x zředěn novým pufrům. Znovu následovalo zkoncentrování na centriconu Amicon (10000 Da cut-off) na objem 2 ml, který byl nanesen na gelovou filtraci na koleně TSK 2000 (kap. 3.2.1.9) ekvilibrovanou odpovídajícím pufrům. V pufru 1 se protein srážel více než v TNC1 pufru, takže tento roztok nebyl na gelovou filtraci nanesen. Přídavek 5 % glycerol i 0,2 % octyl-β-D-glukopyranosid ovlivnil čas eluce RTX HlyA (**Obr. 12**). Po gelové filtraci byly vzorky zkoncentrovány na nejvyšší možnou koncentraci, které bylo dosaženo v pufru 3 a sice 2,5 mg/ml. RTX HlyA v pufru 3 byl nasazen na krystalizační screeny JCSG core suite I-IV (kap. 3.3.1). Zmíněná koncentrace nebyla dostatečná a ke krystalizaci RTX HlyA nedošlo. Rozhodla jsem se dále s tímto konstruktem nepokračovat.



Obr. 11: SDS-PAGE po jednotlivých krocích produkce a purifikace RTX HlyA.



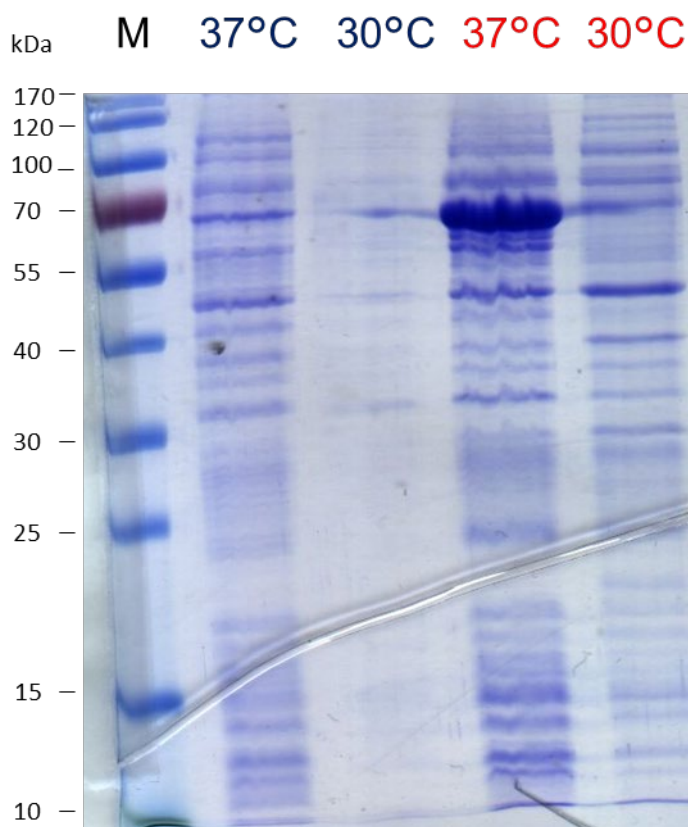
Obr. 12: Chromatogram gelové filtrace RTX HlyA na koloně Superdex200 v jednotlivých pufrch, které měli zlepšit rozpustnost RTX HlyA v roztoku. TNC1 pufr je kontrola. Pufr 2 měl navíc přídavek 5 % glycerolu a pufr 3 0,2 % octyl- β -D-glukopyranosid.

4.1.2 RTX ApxI (722-982)

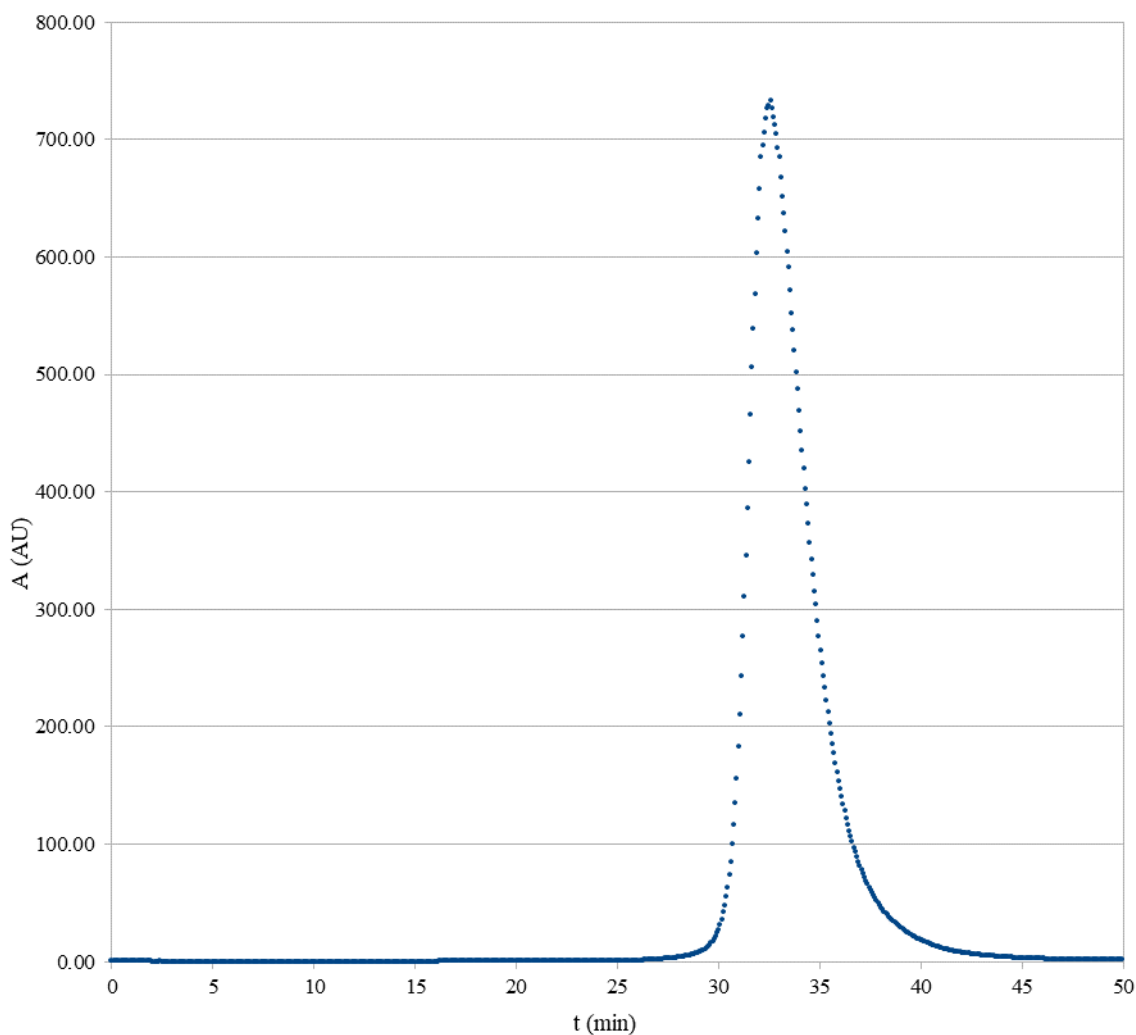
4.1.2.1 Produkce RTX ApxI (722-982) a její optimalizace

Produkce RTX domény ApxI (722-982) (RTX ApxI) probíhala podle postupu v metodách (kap. 3.2.1.1, 3.2.1.2). Purifikace probíhala podle kapitol 3.2.1.3, 3.2.1.5, 3.2.1.6, 3.2.1.7, 3.2.1.9. Po afinitní chromatografii na Glutathione-sepharose bylo množství konstruktů s GST 32,4 mg a po Ni-sepharose bylo množství RTX ApxI 9 mg měřeno metodou podle Bradfordové (kap. 3.2.2.2). Po gelové filtraci koncentrace RTX ApxI už nebyla měřitelná.

Kvůli nízkému výtěžku, který mohl být způsoben agregací RTX ApxI nebo jeho uložením v inkluzních tělískách, jsem snížila teplotu kultivace na 30 °C za použití kmene *Escherichia coli* Arctic Express (DE3). Při této kultivaci nedošlo k produkci proteinu téměř vůbec (**Obr. 13**). Takže jsem se vrátila k původní kultivaci popsané v prvním odstavci za použití močovinné extrakce (kap. 3.2.1.4) za účelem získání RTX ApxI z inkluzních tělísek. Tato optimalizace purifikace umožnila získat dostatečné množství RTX ApxI pro krystalizaci (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**).



Obr. 13: Porovnání produkce RTX ApxI ve 37 °C a 30 °C pomocí SDS- PAGE gelu. Modře označené dráhy jsou kultury před indukcí exprese RTX ApxI. Červeně jsou označeny dráhy po indukcí exprese pomocí IPTG.



Obr. 14: Chromatogram gelové filtrace RTX ApxI po močovinnové extrakci v TNC2 pufru na koloně Superdex200.

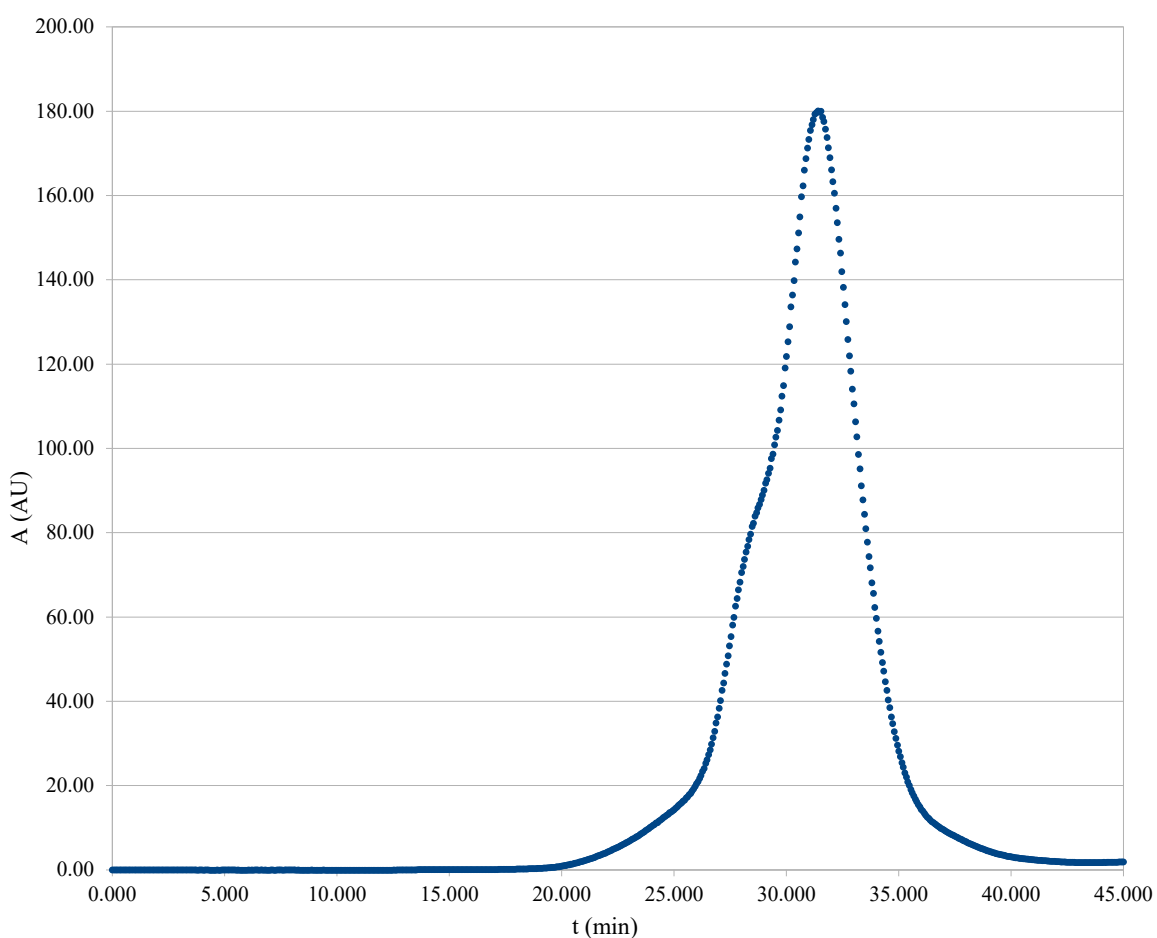
4.1.2.2 Krystalizace RTX ApxI (722-982)

Na screening krystalizačních podmínek byly použity komerční screeny JCSG core suite I-IV, Morpheus a Midas. Po měsíci se v podmínkách JCSG core suite I – B8 (20 % w/v PEG 3350, 0,2 M octan vápenatý) a D12 (20 % w/v PEG 3350, 0,1 M kakodylát sodný, 0,2 M octan hořečnatý) a JCSG core suite II – D12 (20 % w/v PEG 3350, 0,2 M síran litný) se objevily malé krystaly, které nebyly solné. Vykazovaly nicméně jen slabou, nebo žádnou difrakci. Tyto podmínky krystalizace byla optimalizovány ve visících kapkách (kap. 3.3.1.2, 3.3.1.3). Po několika nových produkcích a purifikacích RTX ApxI a optimalizacích krystalizace nebyly získány žádné proteinové krystaly pro na nasbírání difrakčního datasetu. S tímto konstruktem jsem přestala pracovat.

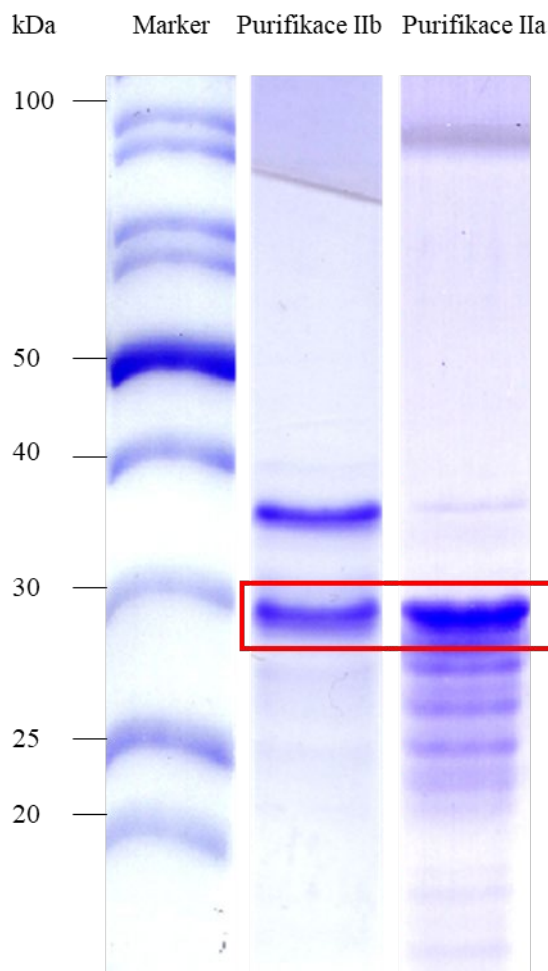
4.1.3 RTX LtxA (722-979)

4.1.3.1 Produkce RTX LtxA (722-979) a její optimalizace

Produkce RTX domény LtxA (722-979) (RTX LtxA) probíhala podle postupu v metodách (kap. 3.2.1.1, 3.2.1.2). Purifikace probíhala podle kapitol 3.2.1.3, 3.2.1.5, 3.2.1.6, 3.2.1.7, a 3.2.1.9 (**Obr. 15**). Později jsem vyměnila Purifikaci IIa za purifikaci IIb kap. 3.2.1.8, která byla rychlejší a stejně efektivní (**Obr. 16**). V různých krocích purifikace se protein RTX LtxA spontánně štěpil, ale před nasazením na krystalizaci, měl vždy podle SDS-PAGE kap. 3.2.2.1 srovnatelnou délku (**Obr. 16**). Finální sekvence krystalizovaného konstruktu byla určena N koncovou sekvenací (kap. 3.2.2.4) a hmotnostní spektrometrií, kterou změřil a vyhodnotil Mgr. David Jurnečka, Ph.D..



Obr. 15: Chromatogram gelové filtrace RTX LtxA v 5 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl a 5 mM CaCl₂ pufru na koloně Superdex200.



Obr. 16: Porovnání SDS-PAGE Purifikace IIa a IIb RTX LtxA, která byla dělána z jedné produkce proteinu. Purifikace IIb srovnatelně efektivní jako Purifikace IIa. Červený obdélník znázorňuje štěpení RTX LtxA v průběhu purifikace. Očekávaná velikost proteinu byla na SDS-PAGE byla cca 37 kDa.

4.1.3.2 Krystalizace RTX LtxA (722-979)

Na screening krystalizačních podmínek byly použity komerční screeny JCSG core suite I-IV, Morpheus a Midas. Po 10 měsících se v podmínce JCSG core suite I – D8 (20 % w/v PEG 3350, 0,2 M síran sodný). Tato podmínka krystalizace byla optimalizovaná ve visících kapkách (kap. 3.3.1.2, 3.3.1.3) společně s dalšími **Tab. 3**. Po měsíci se objevily krystaly, které byly vyloveny pro rentgenovou analýzu na synchrotronu. Jako kryoprotektant byl použit 17 % glycerol.

Difrakční data byla naměřena na synchrotronu Bessy II na stanovišti BL - 14.1??? (kap. 3.3.3) z krystalu získaného z visící kapky z podmínky JCSG core suite I – D8 s poměrovým složením 1:1.

Screen	Pozice	Sůl	Pufř	Precipitant
JCSG I	D8	0,2 M síran sodný		20 % w/v PEG 3350
JCSG III	B10	2,4 M síran amonný	0,1 M Tris pH 8,5	
	D6	2,4 M síran amonný	0,1 M HEPES pH 6,0	
	F8	2,4 M síran amonný	0,1 M MES pH 5,0	

Tab. 3: Podmínky vybrané k optimalizaci krystalizace proteinu RTX LtxA.

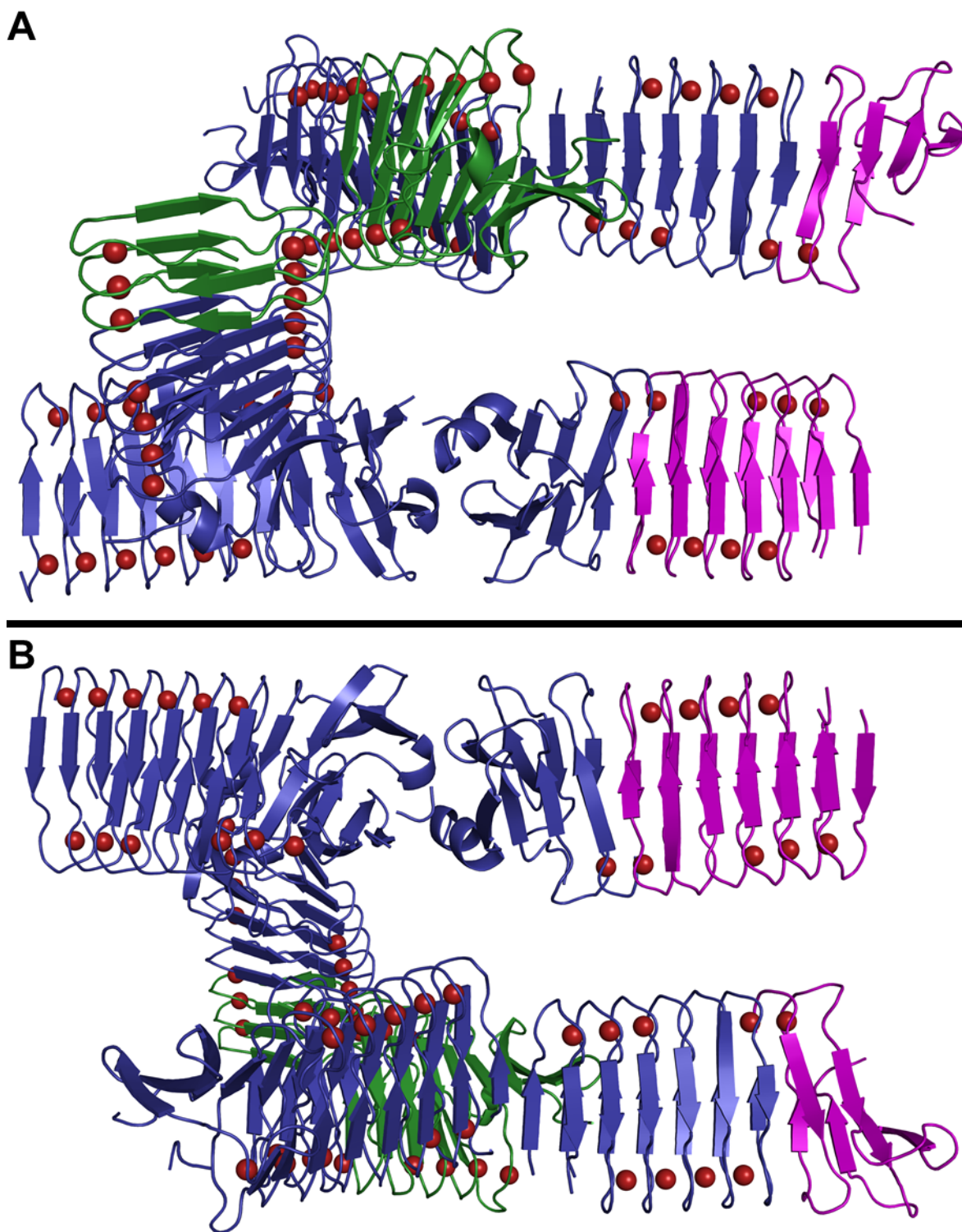
4.1.3.3 Zpracování datasetu RTX LtxA

Dataset byl zpracován podle kapitoly 3.3.3. Vyřešit fázový problém jsem se snažila velmi dlouho s různými modely, které jsem derivovala od 5CVW.pdb (RTX CyaA blok 5) bohužel tento postup nebyl úspěšný. V srpnu roku 2021 fázový problém vyřešil doc. Ing. Petr Kolenko, Ph.D. Statistika sběru dat jsou shrnuty v **Tab. 4**.

Sběr dat	
Vlnová délka zdroje rentgenového záření (Å)	0,9184
Prostorová grupa	Ortorombická I212121 (24)
Rozměry krystalové jednotky	
a, b, c (Å); α , β , γ (°)	93,26, 108,01, 206,37; 90,0, 90,0, 90,0
Rozlišení (Å)	47,85 - 1,70 (1,72 – 1.70)
Počet unikátních reflexí	113649 (5128)
Redundance	7,3 (5,6)
Kompletnost (%)	99,5 (91,6)
$I/\sigma I$	13,8 (0,9)
R_{merge}	0,085 (1,757)
CC (1/2)	0,999 (0,36)

Tab. 4: Předběžné statistiky sběru datasetu z difraktometru pro krystal LtxA.

V předběžně získaném modelu RTX LtxA asymetrická jednotka obsahuje šest molekul LtxA a pouze dvě z nich jsou kompletní. Další zasahují do dvou sousedních asymetrických jednotek (**Obr. 17**). Struktura vypadá podobně jako ostatní RTX domény vyřešených struktur RTX proteinů. Obsahuje pravidelnou RTX beta-roll strukturu s netypickou C-koncovou oblastí tvořenou čtyřmi antiparalelními beta-listy, označovanou jako „folding core“²⁷, stejně jako ostatní dostupné RTX struktury. Podrobněji bude obsažen v následujících kapitolách u dokončených modelů bloku 5 RTX domény CyaA struktury (1528-1681).

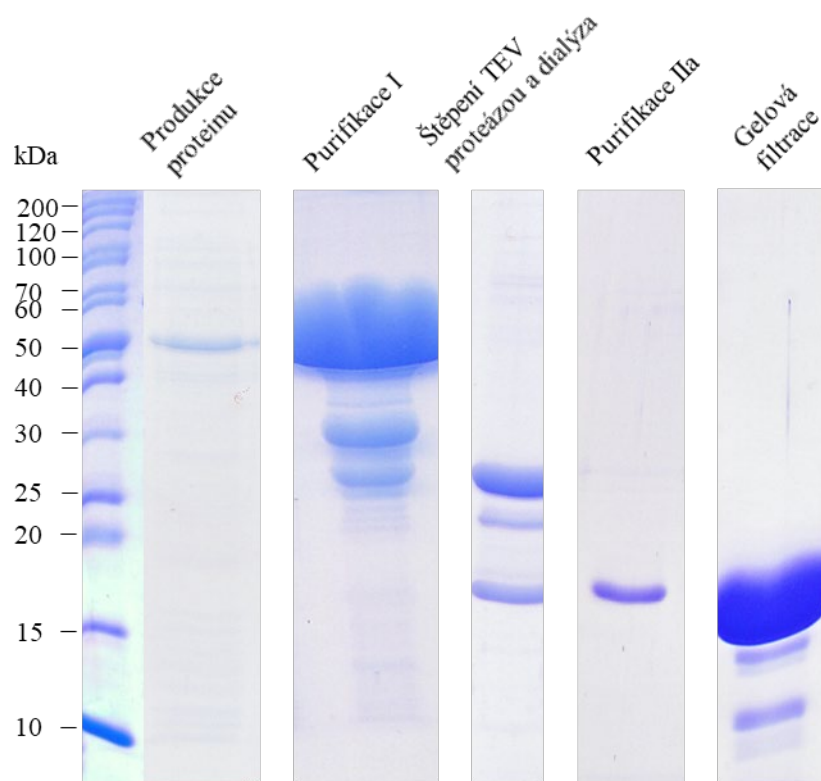


Obr. 17: Asymetrická jednotka krystalu RTX LtxA (modré struktury) s přesahem čtyř molekul ze šesti molekul do dvou sousedních asymetrických jednotek (fialové a zelené struktury). Vápenaté kationy jsou označeny červeně. Verze A a B jsou vůči sobě otočeny o 180° podél osy x.

4.1.4 RTX CyaA blok 5 (1528-1681)

4.1.4.1 Produkce a krystalizace RTX CyaA blok 5 a získání datasetu ze synchrotronu

Produkce a purifikace proteinu bloku 5 RTX domény CyaA (1528-1681) (RTX CyaA blok 5) probíhala podle protokolu z metod (kap. 3.2.1.1, 3.2.1.2, 3.2.1.3, 3.2.1.5, 3.2.1.6, 3.2.1.7, 3.2.1.9). Každý krok byl ověřen SDS-PAGE (kap. 3.2.2.1) (**Obr. 18**).



Obr. 18: SDS-PAGE po jednotlivých krocích produkce a purifikace RTX CyaA blok5.

Na screening krystalizačních podmínek byly použity komerční screeny JCSG core suite I-IV. Z 384 krystalizačních podmínek bylo vybráno sedm, ve kterých se objevily jednotlivé krystaly. Pro optimalizaci krystalizace ve visících kapkách byly vybrány podmínky uvedené v **Tab. 5**.

Screen	Pozice	Sůl	Pufr	Precipitant
JCSG I	C7		0,1 M Tris pH 7,0	20 % w/v PEG 2000 MME
	F2	0,2 M sulfát hořečnatý		20 % w/v PEG 3350
	F4	0,2 M dusičnan hořečnatý		20 % w/v PEG 3350
JCSG II	B2	0,2 M síran lithný	0,1 M Tris pH 8,5	40 % w/v PEG 400
	B7	0,2 M octan lithný		20 % w/v PEG 3350
	H7	0,17 M síran amonný		25,5 % w/v PEG 3350, 15 % v/v Glycerol
JCSG IV	B9	0,2 M chlorid hořečnatý	0,1 M Tris-HCl pH 8,5	30 % w/v PEG 4000

Tab. 5: Krystalizační podmínky, ve kterých vyrostly proteinové krystaly vybrané k optimalizaci krystalizace ve visících kapkách.

Difrakční data byla naměřena na synchrotronu Bessy II na stanovišti BL - 14.1 (kap. 3.3.3) z krystalu získaného z visící kapky s poměrovým složením 1:1 RTX CyaA blok 5 (9 mg/ml): precipitant (0,2 M MgSO₄, 20% w/v PEG 3350). Druhý změřený krystal byl vyloven přímo z krystalizačního screenu ze sedící kapky s poměrovým složením a 1:1 RTX CyaA blok 5 (7 mg/ml): precipitant (0,2 M Mg(NO₃)₂, 20% w/v PEG 3350). Oba krystaly se objevily asi po týdnu krystalizace a jejich rozměry při vylovení byly přibližně 100x100x100 μm. Při lovení byl jako kryoprotektant použit 15 % (w/v) glycerol (kap. 3.3.2.1).

4.1.4.2 Zpracování datasetů a rafinace modelů

Datasety byly zpracovány podle kap 3.3.3. Pro vyřešení fázového problému byla použita metoda molekulárního nahrazení. Jako model pro řešení struktury 5CVW.pdb (první RTX CyaA blok5 struktura v RCSB databázi) byla použita homologní molekula RTX domény protein z bakterie *Serratia marcescens* (pdb kód 1SRP²⁸). Fázový problém byl vyřešen Jackem Lubkowski, Ph.D. Pro vyřešení struktury 5CXL.pdb byla použita molekula 5CVW.pdb. Model struktury 5CXL.pdb (druhá RTX CyaA blok5 struktura v RCSB databázi) neobsahuje 5 posledních AK sekvence proteinového konstrukt, které byly pravděpodobně flexibilní a v mapě elektronových hustot nebyly patrné. V modelu struktury 5CVW.pdb chybí 3 poslední AK ze stejného důvodu. Statistiky rafinace jsou shrnuty v **Tab. 6**. Finální modely byly validovány (kap. 3.3.5) a nahrány do PDB databáze.

	Model CyaA I 1529-1678 (5CVW.pdb)	Model CyaA II 1529-1676 (5CXL.pdb)
Sběr dat		
Prostorová grupa	Ortorombická, I222 (23)	Tetragonální P41212 (92)
Vlnová délka zdroje rentgenového záření (Å)	0.9184	
Rozměry krystalové jednotky		
a, b, c (Å); α , β , γ (°)	62,82, 62,98, 77,63; 90, 90, 90	52,2, 52,2, 195,9; 90, 90, 90
Rozlišení (Å)	29,24–1,25 (1,30–1,25)	50–1,45 (1,54–1,45)
R _{merge}	4,3 % (54,5 %)	5,2 % (74,1 %)
Počet unikátních reflexí	42046 (5116)	49299 (7784)
I / σ I	19,78 (2,48)	22,11 (2,55)
Kompletnost (%)	93,6 (72,3)	99,9 (99,8)
Redundance	4,48 (4,04)	8,55 (8,74)
Rafinace		
Hranice rozlišení (Å)	29,24–1,25 (1,28–1,25)	32,15–1,45 (1,49–1,45)
Celkový počet reflexí	39003 (2321)	46709 (3344)
R _{work} / R _{free}	0,139 (0,171) / 0,166 (0,202)	0,148 (0,185) / 0,207 (0,275)
Celkový počet atomů	1263	2417
Protein	1107	2172
Ligand/ion	32	24
Voda	124	221
Celkový B-faktor	17,73	22,57
Protein	14,54	21,62
Ligand/ion	21,56	20,81
Voda	29,52	32,791
R.m.s. odchylka		
Délka vazeb (Å)	0,048	0,019
Úhel vazeb (°)	2,203	1,92
Ramachandranovo vynesení		
Preferovaná oblast (%)	97,3	95,21
Povolená oblast (%)	2,7	4,47
Odlehlé atomy (%)	0	0,32
AA, které nebylo možné namodelovat	AK1679-1681	AK 1677-1681

Tab. 6: Statistiky sběru dat a rafinace modelů struktur RTX CyaA bloku 5. Hodnoty v závorkách platí pro slupku s nejvyšším rozlišením. Statistiky pro Ramachandranovo vynesení byly získány z MolProbity softwaru¹¹¹.

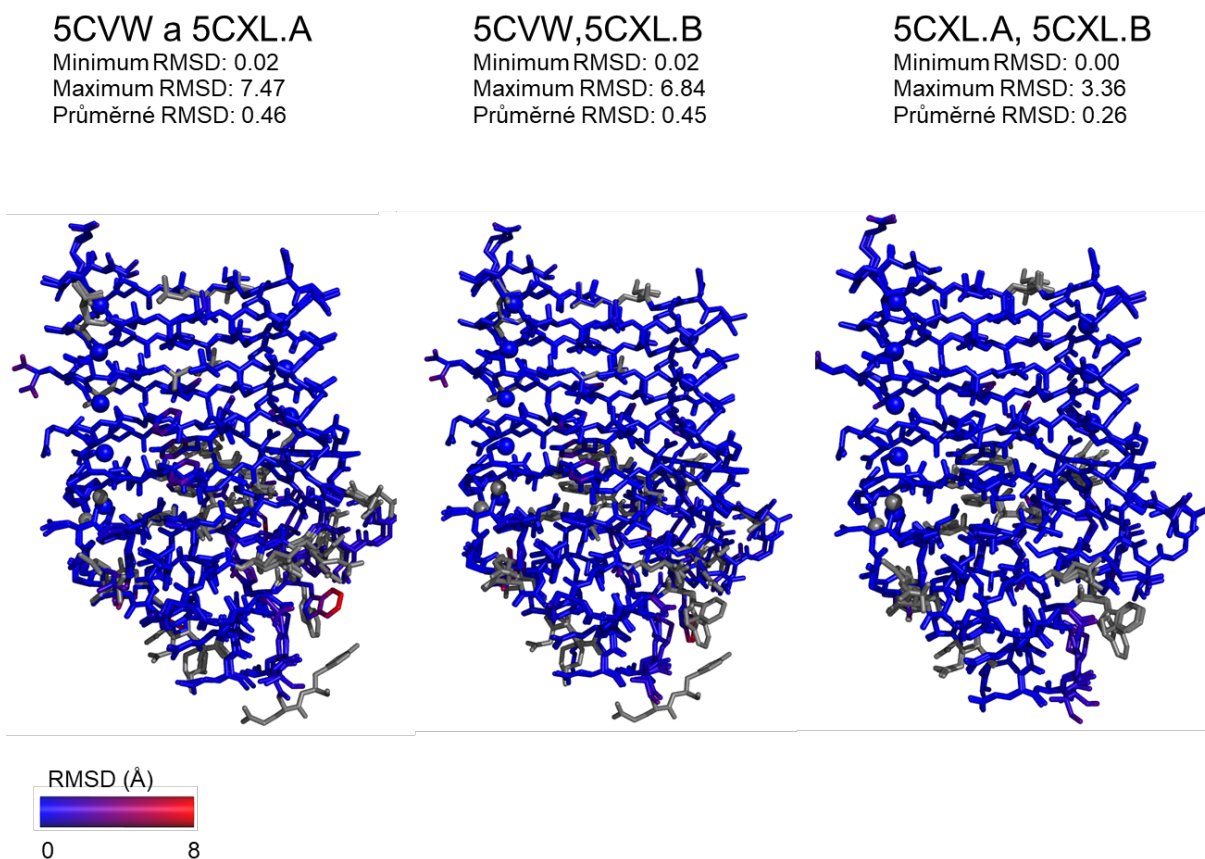
4.1.4.3 Popis struktury RTX CyaA blok 5

Struktury RTX CyaA bloku 5 byly vyřešeny v rozlišení 1,25 Å and 1,45 Å. Tetragonální krystal (5CXL.pdb) obsahoval 2 molekuly v asymetrické jednotce, čímž jsme získali 3 modely RTX CyaA bloku 5.

Modely všech tří struktur byly prakticky identické (**Obr. 19**). V modelu bylo možné rozpoznat osm vápenatých kationů, které stabilizují oblast RTX repetice a umožňují tvorbu pravidelného beta-rollu s netypickou C-koncovou oblastí tvořenou čtyřmi antiparalelními beta-listy, označovanou jako „folding core“²⁷ a s přilehlým amfipatickým alfa-helixem uzavírajícím beta-roll blok. Sedm vápenatých kationů je koordinováno karbonylovými skupinami postranních řetězců, a především karboxy skupinami aspartátu z RTX repetice.

Pouze jeden vápenatý kation, umístěný nejbližší C-konci proteinu je navíc koordinován dvěma molekulami vody. Hydrofobní strana C-koncového alfa-helixu uzavírá beta-roll strukturu RTX repetice.

Molekuly 5CVW.A a 5CVW.B jsou v asymetrické jednotce spojeny hydrofobní interakcí plochých povrchů pravidelného beta-rollu¹¹³ a zároveň nepřímo vodíkovými můstky mezi molekulami vody a smyčkami na hraně beta-rollu.



Obr. 19: Strukturální alignment modelů RTX CyaA bloku 5 vyřešených struktur, označených jejich pdb kódy a zpracovaný pomocí software Pymol¹¹⁴ modulem ColorByRMSD (Shandilya S., Vertrees J., Holder T. (2012) ColorByRMSD [python], dostupný na <http://www.pymolwiki.org/index.php/ColorByRMSD> (použitý 8.9.2015). Molekulové páry jsou obarveny pomocí škály RMSD (Å) v modro-červeném spektru. Zvolená škála RMSD od 0 do 8 neumožňuje vidět prakticky žádné rozdíly kromě jednoho Trp.

4.1.5 RTX CyaA Blok 4-5 (1371-1681)

4.1.5.1 Produkce a krystalizace RTX CyaA blok 4-5

Produkce a purifikace proteinu RTX CyaA blok 4-5 probíhala bez potíží postupně podle kapitol 3.2.1.1, 3.2.1.2, 3.2.1.3, 3.2.1.5, 3.2.1.6, 3.2.1.8 a 3.2.1.9. Byla provedena Ivou Maršíkovou. Na screening krystalizačních podmínek byly použity komerční screeny JCSG core suite I-IV. Krystalizační screeny byly nasazeny Mgr. Nelou Klímovou za její asistence. Práci jsem od ní převzala ve fázi kontroly krystalizačních screenů.

4.1.5.2 Optimalizace krystalizace RTX CyaA blok 4-5

Pro optimalizaci krystalizace ve visících kapkách jsem vybrala podmínku z krystalizačního screenu JCSG I E1 (0,2 M dusičnan amonný, 20 % w/v PEG 3350). Podmínka byla nasazena ve visících kapkách v několika variantách s různými koncentracemi PEG 3350 (kap. 3.3.1.3). Přesto byl finální krystal vyloven z visící kapky s poměrem protein:precipitant 1:1 v původním složení.

Difrakční data byla naměřena na synchrotronu Bessy II na stanovišti BL - 14.2 (kap. 3.3.3).

4.1.5.3 Zpracování difrakčních dat a rafinace

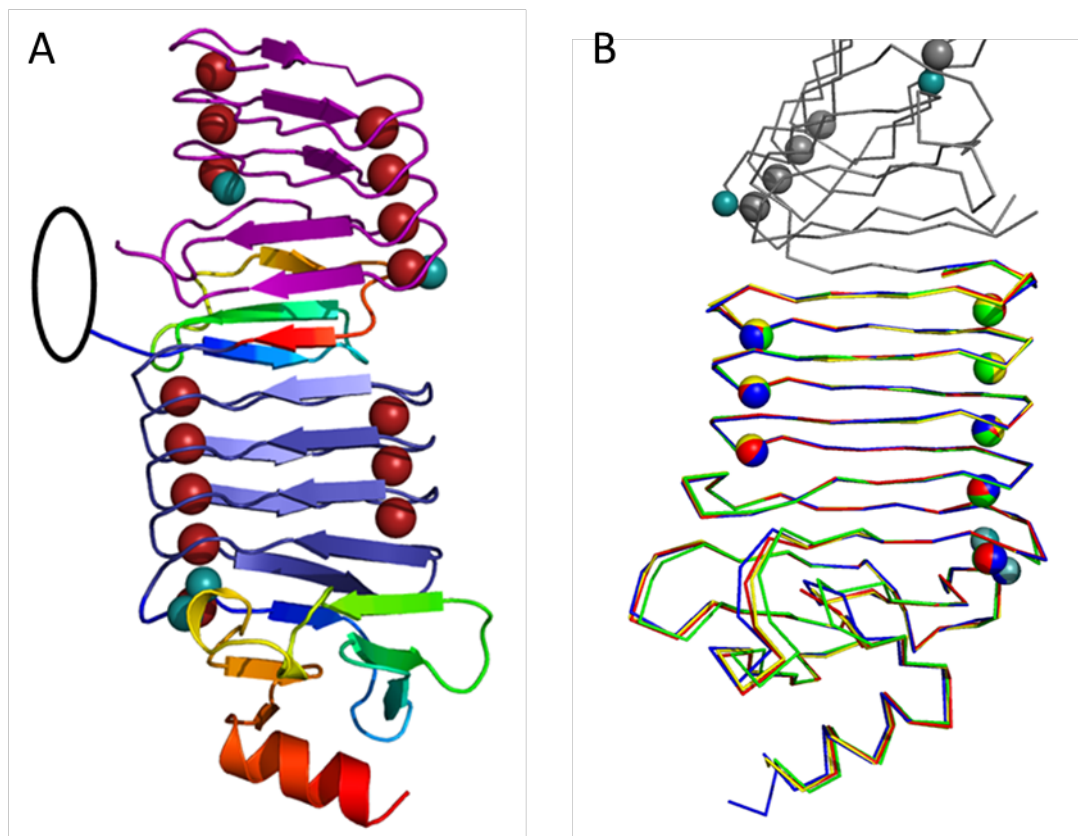
Dataset byl zpracován podle kapitoly 3.3.3. Pro vyřešení fázového problému byla použita metoda molekulárního nahrazení. Jako model pro řešení struktury RTX CyaA blok 4-5 (6SUS.pdb) byla použita struktura RTX CyaA bloku 5 5CVW.pdb. Model struktury 6SUS.pdb neobsahuje AK 1371-1409, AK 1489-1496 a AK 1676-16815 AK. Chybějící aminokyseliny nebylo možné namodelovat, protože pro ně chyběla mapa elektronových hustot pravděpodobně kvůli flexibilitě molekuly v těchto místech, nebo v případě N-konce mohlo dojít k odštěpení konce RTX repetice (tato hypotéza nebyla ověřena experimentálně). Statistiky rafinace jsou shrnuty v tabulce **Tab. 7**. Finální model byl validován (kap. 3.3.5) a nahrán do PDB databáze.

Sběr dat	
PDB kód	6SUS
Vlnová délka zdroje rentgenového záření (Å)	0,9184
Prostorová grupa	Tetragonální P43212 (96)
Rozměry krystalové jednotky	
a, b, c (Å); α , β , γ (°)	91,77, 91,77, 104,47; 90, 90, 90
Rozlišení (Å)	45,89-1,76 (1,87-1,76)
Počet unikátních reflexí	44820 (7085)
Redundance	8,9 (9,0)
Kompletnost (%)	99,8 (99,5)
$I/\sigma I$	24,66 (2,69)
R_{merge}	0,052 (0,831)
Rafinace	
Hranice rozlišení (Å)	45,89-1,76 (1,81-1,76)
Celkový počet reflexí	42719 (3226)
Počet reflexí v pracovní sadě	40619 (3075)
Počet reflexí v testovací sadě	2100 (151)
R/R_{free} (%)	18,4/20,0 (26,2/27,3)
Celkový počet atomů bez vodíků	2248
Celkový počet proteinových atomů bez vodíku	2008
Počet vápenatých kationů	15
Počet molekul vody	177
Průměrný B-factor (Å ²)	35,52
Proteinové atomy (Å ²)	36,18
Voda (Å ²)	43,32
Vápenaté kationy (Å ²)	29,39
Ramachandran Plot (%)	
Preferovaná oblast (%)	96
Povolená oblast (%)	4
Odlehlé atomy (%)	0
R.m.s. odchylka (Å)	
Délka vazeb (Å)	
Úhel vazeb (°)	0,008
Planarita (Å)	1,187
Chirální centra (Å ³)	0,053
AA, které nebylo možné namodelovat	AK 1371-1409; AK 1489-1496; AK 1676-1681

Tab. 7: Statistiky sběru dat a rafinace modelu struktury RTX CyaA bloku 4-5. Hodnoty v závorkách platí pro slupku s nejvyšším rozlišením. Statistiky pro Ramachandranovo vynesení byly získány z MolProbity 4.02b-467 softwaru¹¹¹.

4.1.5.4 Popis struktury RTX CyaA blok 4-5

Struktura získaná z tetragonálního krystalu RTX CyaA blok 4-5 byla vyřešena v rozlišení 1,77 Å. Finální model je tvořen aminokyselinami 1410-1488 a 1497-1675 (**Obr. 20A**). Strukturní alignment všech vyřešených struktur RTX CyaA bloku 5 (5CVW.pdb²⁷, 5CLX.pdb²⁷, 6SUS.pdb⁴⁰) potvrdil, že se mezi sebou jednotlivé struktury nijak neliší, i když vzešly z různých krystalizačních podmínek a krystalových uspořádání (**Obr. 20B**), což naznačuje, že jde o reprezentativní strukturu.

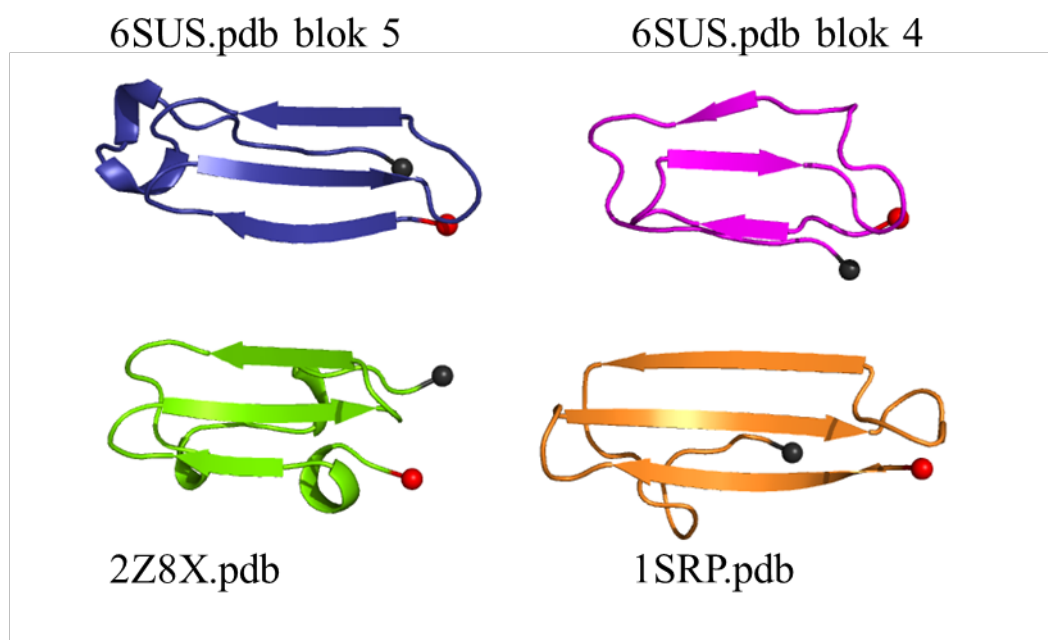


Obr. 20A: Strukturní model RTX CyaA blok 4-5 AK 1410-1488 a 1497-1675: RTX blok 4 (fialová), RTX blok 5 (modrá), C-koncové části RTX bloků (duhové), vápenaté iony (červené), molekuly vody, které se podílejí na koordinaci vápenatých ionů (světle modré). Černý kruh znázorňuje flexibilní smyčku, kterou se nepodařilo namodelovat do map elektronových hustot (AK 1489-1497). **B:** Strukturní alignment všech RTX blok 5 vyřešených struktur: 5CVW.pdb (zelená), 5CXL.pdb A (žlutá), 5CXL.pdb B (červená), 6SUS.pdb (modrá RTX CyaA blok 5, šedá RTX CyaA blok 4). Alignment byl získán z programu PyMOL¹¹⁴ verze 0.7 (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.0.0. Schrödinger, LLC).

Model struktury se skládá ze dvou pravidelných plochých beta-rollů RTX bloků CyaA 4 a 5 tvořených nonapeptidovými repeticemi, které v ohybech jednotlivých otáček stabilizují vápenaté kationy. Každý RTX blok je ukončen přilehlou oblastí, v případě RTX bloku 5 je tato oblast označovaná, jako “folding core”²⁷. Přilehlá oblast RTX bloku 4 je strukturně obdobná “folding core” bloku 5, ačkoli sekvenční podobnost je nízká, a tvoří ohyb v propojení mezi RTX bloky 4 a 5.

Každá krystalografická struktura RTX domény obsahuje zmíněnou přilehlou oblast RTX repetice s obdobnou strukturou, ale s nízkou sekvenční podobností, např. proteáza z bakterií *Serratia sp.* (1SRP.pdb²⁸) nebo extracelulární lipáza z bakterií *Pseudomonas sp.* (2Z8X.pdb⁴²) (**Obr. 21**).

Model struktury 6SUS.pdb obsahuje 15 vápenatých ionů, které jsou většinou koordinovány karboxy skupinami aspartátů z pravidelných repetic, které v jejich pozici v repetici výjimečně zastoupí karboxy skupina glutamátu, nebo karboxyamidová skupina asparaginu. Dále se na koordinaci vápenatých ionů podílí karbonylové skupiny AK z nonapeptidových repetic. Tři vápenaté iony jsou zároveň koordinovány molekulami vody. Počet vápenatých ionů přesně odpovídá počtu namodelovaných obrátek (**Obr. 20**). Hydrofobní strana C-koncového amfipatického alfa-helixu uzavírá beta-roll RTX bloku 5 stejně, jako ve strukturách CVW.pdb a 5CXL.pdb.



CyaA5 (1619-1658)	QLW---FAR---QGNDLEIRILGTDALTVHDWYRDADHRVEI IHA
CyaA4 (1498-1531)	KGV---FLS---LGKGFAS-LM-DE--PETS NVLRNIENA--VGSA
2Z8X (577-617)	DDF---RAHASMVGQD TVLKFFGGDSV--TLVGVALNSLSADGIVIA
1SRP (427-471)	AGEALLSYNASNNVTDL SVNIGGHQAPDFLVKIV-GQVDVATDFIV
cons	. : . . .

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: CyaA5 (1619-1658)	100.00	11.76	18.42	10.26
2: CyaA4 (1498-1531)	11.76	100.00	18.18	3.03
3: 2Z8X (577-617)	18.42	18.18	100.00	20.00
4: 1SRP (427-471)	10.26	3.03	20.00	100.00

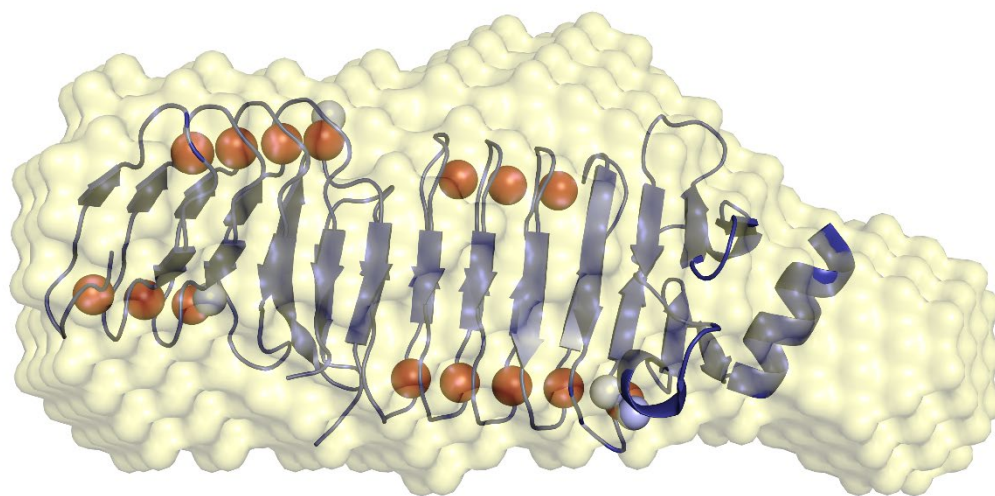
Obr. 21: Porovnání přilehlých oblastí RTX bloků: RTX CyaA blok 5 (6SUS.pdb), možné „folding core“ celého CyaA toxinu (modrá); RTX CyaA blok 4 (6SUS.pdb), spojení mezi bloky 4 a 5 (purpurová); druhý RTX blok z extracelulární lipázy z bakterií *Pseudomonas* sp. (2Z8X.pdb⁴²) (zelená); proteáza z bakterií *Serratia* sp. (1SRP.pdb²⁸) (oranžová). N-konec je označen červenou kuličkou a C-konec černou. Strukturální podobnost těchto modelů je vysoká, ale sekvenční podobnost velmi nízká, což je znázorněno sekvenčním alignmentem zobrazených struktur, který byl proveden v programu Clustal2.1¹¹⁵.

4.1.5.5 Porovnání SAXS modelem obálky RTX bloku 4-5 s krystalografickou strukturou 6SUS.pdb

Porovnání tvaru molekuly z krystalu s tvarem molekuly v roztoku umožňuje potvrdit validitu krystalografické struktury. Krystaly většinou vznikají v podmínkách velmi vzdálených od podmínek, ve kterých se proteiny zkoumají, a to by mohlo ovlivnit jejich konformaci.

SAXS (maloúhlový RTG rozptyl z angl. **S**mall **A**nge **X**-ray **S**cattering) data nasbírali Ladislav Bumba a Nela Klímová na P12 beamline EMBL DESY (Deutsches Elektronen-Synchrotron DESY Ein Forschungszentrum der Helmholtz-Gemeinschaft). Data zpracoval Michael Kachala, Ph.D.

Model krystalové struktury 6SUS.pdb dobře vyplňuje SAXS obálku CyaA RTX bloku 4-5 (SASDJU3 kód v z angl. Small Angle Scattering Biological Data Bank - SASBDB). Tento výsledek také naznačuje, že minimálně propojení mezi CyaA RTX blokem 4 a 5 je rigidní a nepřetržitý spoj mezi oběma je beta-rolly nejen v krystalové struktuře, ale i v roztoku (10 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂), ve kterém jsou měřena SAXS data a ve kterém se s CyaA běžně zkoumá.



Obr. 22: Proložení krystalové struktury 6SUS.pdb (AK – tmavě modrá, Ca kationy – červená, H₂O koordinující Ca kationy – světle modrá) a obálky získané ze SAXS dat (světle žlutá).

4.2 Vytvoření modelu RTX domény CyaA a jeho porovnání se SAXS modelem obálky

Na základě strukturní podobnosti RTX domén vyřešených RTX proteinů byl vytvořen model celé RTX domény CyaA. CyaA RTX bloky byly vystavěny metodou homologního modelování na serveru SWISS-MODEL¹¹⁶⁻¹¹⁸. Vybraný templát pro RTX bloky 1-3 byla struktura 6SUS.pdb. Části, které nebyly tímto způsobem vystavěny (fragments propojení mezi jednotlivými RTX bloky, N-konec RTX bloku 5), byly namodelovány manuálně za použití programů PyMOL¹¹⁴ verze (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.0.0.

Schrödinger, LLC), Coot 0.7¹⁰⁹ a Chainsaw¹¹⁹. Výběr templátu závisel na sekvenční podobnosti a počtu aminokyselin predikovaných pro jednotlivé propojovací úseky. Jako templát propojení mezi RTX bloky 1 a 2 (AK 1133-1137) bylo použito propojení mezi RTX bloky 4 a 5. Propojení mezi RTX bloky 2 a 3 (AK 1212-1261) a 3 a 4 (AK 1365-1376) bylo namodelováno podle „folding core“ RTX domény extracelulární lipázy LipA z bakterie *Serratia marcescens* (2QUB.pdb)¹⁷. N-koncová část RTX beta-rollu RTX bloku 4 (AK1377-1408) byla vytvořena podle velikostně odpovídající části N-konce RTX bloku 4 ve struktuře 6SUS.pdb (**Obr. 23**). Pro rafinaci beta listů především u propojení jednotlivých RTX bloků byl použit skript napsaný Ing. Jiřím Černým pro program Modeller¹²⁰.

Block 1

1009 - HVQHII GGAGNDSIT GNAHDNFLA GSGDDRLD GGAGNDTLV GGEGQNTVI
GGAGDDVFL QDLGVWSNQLD GGAGVDTVK
YNVHQPSEERLERMGDTGIHADLQKGTVEKWPALNLFVVDHVKNIENLH

Block 2

GSRLNDRIA GDDQDNELW GHDGNDTIR GRGGDDILR GGLGLDTLY GEDGNDIFL
QDDETVSDDID GGAGLDTVD YSAMIHPGRIVAPHEYGFGIEADLSREWVRKASAL

Block 3

GVDYYDNVRNVENVI GTSMKDVLIQDAQANTLM GQGGDDTVR GGDGDDLLF GGDGNDMLY
GDAGNDTLY GGLGDDTLE GGAGNDWFG QTQAREHDVLR GGDGVDTVD
YSQTGAHAGIAAGRIGLILADL

Block 4

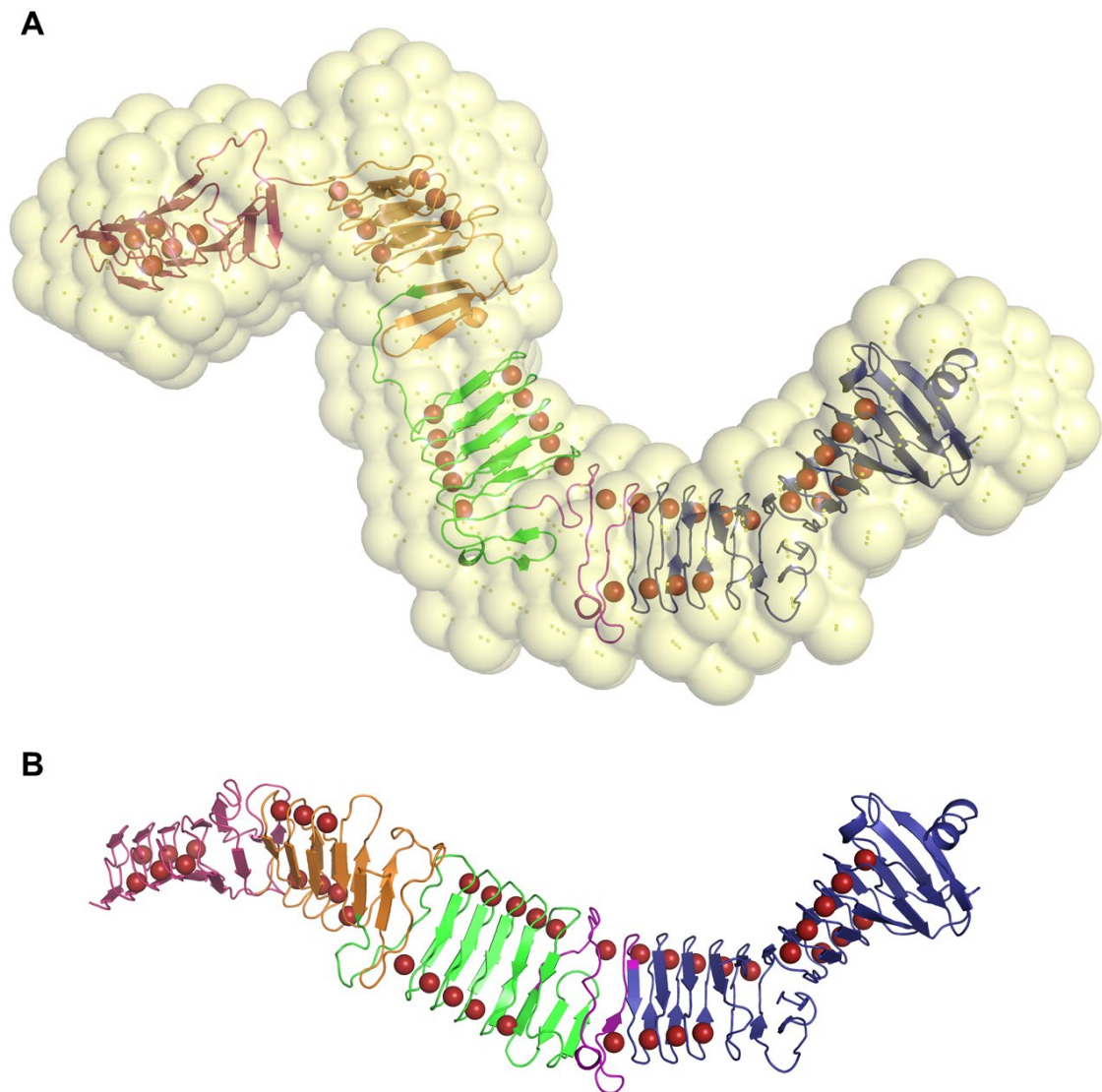
GAGRVDKLGEA GSSAYDTVSGIENVV GTELADRIT GDAQANVLR GAGGADVLA
GGEGDDVLL GGDGDDQLS GDAGRDRLY GEAGDDWFF QDAANAGNLLD GGDGRDTPD
FSGPGRGLDAGA KGVFLSLGKGFASLMDEPETS NVLRNIENAV

Block 5

GSARDDVLI GDAGANVLN GLAGNDVLS GGAGDDVLL GDEGS DLLS GDAGNDDL F
GGQGD DTYLFG VGYGHDTIYE SGGGHDTIR
INAGADQLWFARQGNLEIRILGTDDALTVHDWYRDADHRVEI IHAANQAVDQAGIEKLVEAM
- 1675

Obr. 23: Sekvence CyaA RTX domény rozdělena do pěti RTX predikovaných bloků^{52,121} s pravidelným beta-rolllem tvořeným RTX repeticemi (každá repetice je oddělena mezerou od následující repetice), oblastmi propojujícími jednotlivé bloky a „folding core“ (kurziva). 6SUS.pdb je označena červeně, části namodelované na serveru SWISS-MODEL jsou označeny zeleně, ručně namodelované oblasti mezi jednotlivými bloky modře a stejně jako N-konec RTX bloku 4.

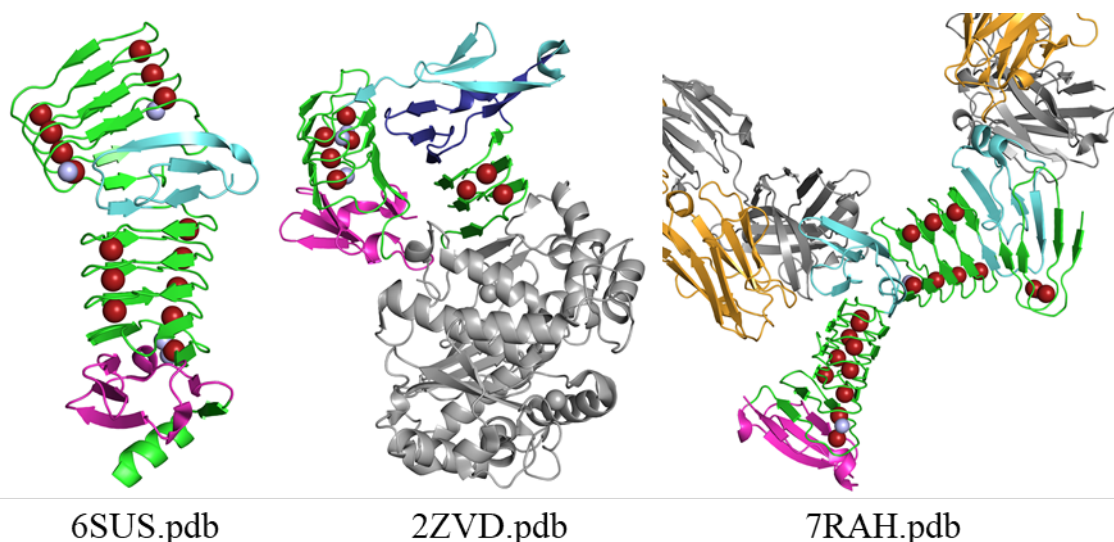
Byly vytvořeny dva modely. Jeden použil jako „formu“ obálku získanou ze SAXS dat celé RTX domény (SASDB74), která naznačuje flexibilnější propojení mezi CyaA RTX bloky (**Obr. 24A**). Druhý model byl postavený na hypotéze, že mezi všemi zbývajícimi bloky CyaA RTX domény je stejné rigidní propojení jako mezi RTX CyaA blokem 4 a 5, čímž vznikne kontinuální beta-roll struktura⁴⁰ (**Obr. 24B**). Do finálních modelů bylo také přidáno 41 Ca kationů, což odpovídá predikci vazebných míst Ca kationů¹²².



Obr. 24: Modely CyaA RTX domény vytvořené homologním modelováním (Struktura 6SUS – modrá, zbytek CyaA RTX bloku 4 – fialová, CyaA RTX blok 3 – zelená, CyaA RTX blok 2 – oranžová, CyaA RTX blok 1 – růžová, Ca kationy – červená). **A:** Pro tvorbu modelu byla použita SAXS struktura jako forma. **B:** Model byl vytvořený na základě hypotézy, že všechny CyaA RTX bloky na sebe navazují stejně jako CyaA RTX bloky 4 a 5.

5 Diskuze

Podářilo se získat struktury RTX LtxA, RTX CyaA blok 5 a RTX CyaA bloky 4 a 5. Struktury RTX LtxA (**Obr. 17**), RTX CyaA blok 5²⁷ a RTX CyaA bloky 4 a 5⁴⁰ mají typickou beta-roll konformaci s „folding core“ na C-konci a v RTX repetičích obsahují Ca²⁺ kationy. Novinkou je přechod mezi RTX CyaA bloky 4 a 5 (6SUS.pdb) dlouhý 42 AK⁵², který je strukturně velmi podobný „folding core“ a umožňuje vznik kontinuální beta-roll struktury. Oproti tomu lipáza z rodiny I.3 bakterie *Pseudomonas* sp. MIS38 (2ZVD.pdb⁴⁴) obsahující také dva RTX bloky, které ovšem obsahují zlom na přechodu mezi nimi, takže RTX bloky leží laterálně vedle sebe¹⁷. Konformace přechodu RTX bloků u lipáz ovšem také obsahuje strukturně podobný přechod jako je ten mezi RTX CyaA bloky 4 a 5, ale ve dvou kopiích „folding core“ podobné struktury. V září 2021 byla navíc vyřešena struktura RTX CyaA bloků 1 – 3 (7RAH.pdb) s „folding core“ bloku 5 v komplexu s dvěmi neutralizujícími protilátkami M1H5 Fab a M2B10 Fab, které se vážou na intergrin CD11b/CD18⁴¹ vazebné místo CyaA¹²³. Přechody mezi RTX CyaA bloky 1 a 2 a 2 a 3 jsou strukturně opět podobné přechodům mezi RTX CyaA bloky 4 a 5 a umožňují vznik kontinuálního beta-rollu (**Obr. 25**). Otázkou zůstává, jestli vazba protilátek, nezpůsobila stabilizaci přechodů mezi RTX CyaA bloky 1 a 2 a 2 a 3, které by bez této interakce mohly být flexibilnější, jak naznačují SAXS data.



Obr. 25: Porovnání „folding core“ (fialová) a přechodových oblastí mezi RTX bloky krystalografických struktur RTX proteinů. Propojení mezi RTX bloky vykazují rozdíly v ohebnosti a počtu „folding core“ podobných struktur (akvamarínová). Je zde vidět, že propojení mezi RTX bloky v 2ZVD.pdb⁴⁴ je mnohem flexibilnější a obsahuje dvě „folding core“ podobné struktury (akvamarínová a modrá). Oproti tomu propojení RTX CyaA bloků 1 a 2 a 2 a 3 (7RAH.pdb⁴¹) odpovídá propojení RTX CyaA 4 a 5 (6SUS.pdb) celá RTX CyaA doména pravděpodobně tvoří kontinuální beta roll. Ca²⁺ kationy jsou zobrazeny červenými koulemi, atomy kyslíku z vod koordinujících Ca²⁺ kationy světle modře, šedě je katalytická doména 2ZVD.pdb lipázy a M1h5 FAB a M2b10 FAB lehké řetězce, zatímco oranžově M1h5 FAB a M2b10 FAB těžké řetězce.

Nicméně struktura podobná „folding core“ předsazená před RTX CyaA blok 4 nestačí pro Ca²⁺ balení CyaA proteinu do nativní konformace. Vždy musí být přítomno „folding core“ RTX CyaA bloku 5^{27,52}. Jak už bylo zmíněno v Přehledu literatury (kap. 2.1.4) balení

RTX domén do nativní konformace je do značné míry proces poháněný snížením entropie C-konce, jak ukázal Shur *et al.* v roce 2011 ukázal, že „folding core“ mohlo být nahrazeno pevným substrátem a k vápník závislému sbalení proteinu stejně došlo¹²⁴, „folding core“ podobná struktura předsazená před RTX CyaA blok 4 je pravděpodobně moc krátká, aby mohla sama vytvořit nukleaci balení CyaA do nativní konformace.

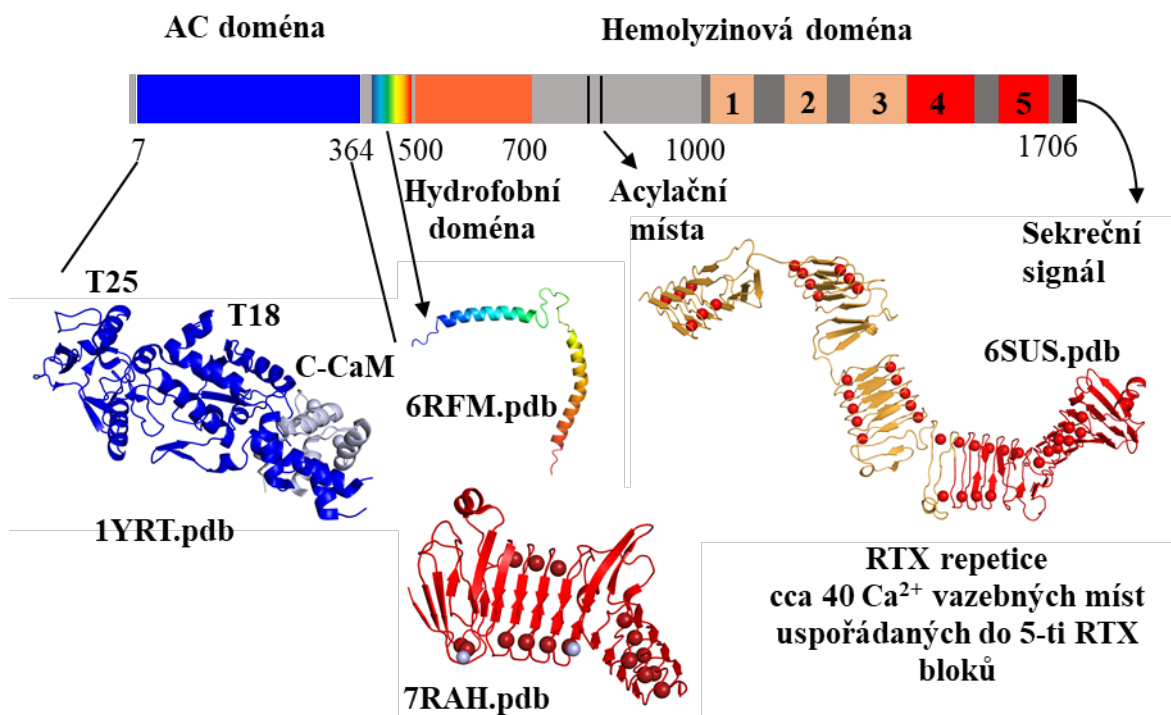
Zajímavé také je, že Ca^{2+} kation koordinovaný poslední Glu 1525 RTX z poslední RTX repetice (od C-konce) RTX CyaA bloku 5 zároveň interaguje s Asp 1482, tedy první RTX repetici RTX CyaA bloku 4. Naznačuje to i kontinuálního balení RTX domény v průběhu sekrece⁴⁰.

C-koncové nonapeptidové repetice obsahují sekvenční konsensus GGXGXDXUX, kde X může být kterákoli aminokyselina (AK) a U je hydrofobní AK^{4,17,18}. Čím blíže je RTX repetice C-konci proteinu RTX CyaA bloku, tím je větší pravděpodobnost narušení nonapeptidového konsensu například jeho rozšířením o další AK a větší expozici Ca^{2+} kationů, kterým pak k hexakoordinaci napomáhají molekuly vody (**Obr. 25**)⁴⁰.

V Motlova *et al.* 2020 bylo ukázáno, že sekreci zkracuje délka RTX CyaA domény, blok po bloku, dokud nezůstane pouze RTX CyaA blok 5, který je esenciální pro balení proteinu, dochází k snižování efektivity sekrece CyaA přes T1SS. Toto dokládá velikost domén u MARTX proteinů¹²⁵ a RTX adhezinů³⁶.

Na základě SAXS dat a poznatků o všech RTX vyřešených strukturách byly vystavěny dva modely celé CyaA RTX domény (Obr. 24). Podle předpokladu do nich bylo umístěno předpovídaných 40 RTX repetice sbalených do pěti RTX po sobě jdoucích bloků, které koordinují 41 Ca^{2+} kationů, což odpovídá predikci vazebných míst Ca kationů¹²².

Velká část struktury CyaA toxinu už se podařila získat (**Obr. 26**), ještě chybí hydrofobní doména a acylační místa. Celá struktura se pravděpodobně nikdy nepodaří vykrytalizovat, ale možné použití např. elektronové mikroskopie by mohlo osvětlit zbývající slepá místa



Obr. 26: Přehled vyřešených částí CyaA toxinu bakterie *Bordetella pertussis* a jeden z modelů vytvořených na základě SAXS dat. AC doména je vyznačená modře⁸⁰, úsek 411-490 AK, který je esenciální pro translokaci AC domény, je duhově¹²⁶, hydrofobní doména s predikovanými hydrofobními alfa helixy zodpovědnými za kanálotvornou aktivitu oranžově. Jednotlivé RTX bloky RTX domény jsou ve schématu označeny oranžově (homologně namodelované) a červeně označeny (struktura 6SUS.pdb). Zároveň je zde zobrazena struktura RTX bloků 1-3 (7RAH.pdb)⁴¹, která byla vyřešena v září 2021 a doplňuje model RTX domény.

6 Souhrn

Cíle práce:

- 1. Získání struktur RTX domén Roentgenovou strukturní krystalografií**
 - a. RTX domény ApxI (*Actinobacillus pleuropneumoniae*-RTX-toxin I) z bakterie *Actinobacillus pleuropneumoniae*
 - b. HlyA (Alfa-hemolysin) z bakterie *Escherichia coli*
 - c. LtxA (Leukotoxin A) z bakterie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
 - d. bloky 4 a 5 RTX domény CyaA (adenylátcyklázový toxin) z bakterie *Bordetella pertussis*
- 2. Popis získaných struktur a jejich porovnání s již vyřešenými RTX strukturami a odhalení společných rysů, které mohou být důležité pro balení do nativní konformace**
- 3. Stavba modelu celé RTX domény CyaA na základě získaných výsledků**

Cíle práce se podařilo částečně naplnit. Byly získány struktury RTX LtxA, RTX CyaA blok 5 a RTX CyaA bloky 4 a 5. Struktury RTX CyaA blok 5²⁷ a RTX CyaA bloky 4 a 5⁴⁰ byly již publikovány a nahrány do RCSB databáze. Struktury RTX ApxI a Hly se bohužel získat nepodařilo.

RTX CyaA bloky 4 a 5 na sebe navazují přechodem, který je na rozdíl od lipázy z bakterie *Pseudomonas* sp., kontinuální bez zlomu, takže beta roll, plynule pokračuje v celé délce.

Počet RTX repetit určuje schopnost sekrece RTX proteinu z bakteriální buňky za pomoci T1SS. Čím větší je sekretovaný protein, tím víc potřebuje RTX repetit na svoji translokaci.

Na základě získání krystalografických struktur RTX CyaA bloků 4 a 5 a SAXS dat RTX domény CyaA byl vytvořen atomární modely celé RTX domény. První model RTX domény byl tvořen vkládáním RTX bloků do SAXS obálky a tvorbou přechodů mezi nimi, na základě tvaru SAXS obálky a zohledněním struktury přechodových oblastí mezi RTX bloky RTX proteinů. Druhý model opět zohlednil struktury přechodových oblastí mezi RTX bloky, tenkrát byl ale vytvořen kontinuální beta roll podle vzoru přechodu mezi RTX CyaA bloků 4 a 5.

7 Seznam použité literatury

- (1) Linhartova, I.; Osicka, R.; Bumba, L.; Masin, J.; Sebo, P. RTX Toxins: A Review. In *Microbial Toxins*; Gopalakrishnakone, P., Stiles, B., Alape-Girón, A., Dubreuil, J. D., Mandal, M., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2015; pp 1–29. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6725-6_13-1.
- (2) Frey, J. RTX Toxins of Animal Pathogens and Their Role as Antigens in Vaccines and Diagnostics. *Toxins* **2019**, *11* (12), 719. <https://doi.org/10.3390/toxins11120719>.
- (3) Coote, J. G. Structural and Functional Relationships among the RTX Toxin Determinants of Gram-Negative Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **1992**, *8* (2), 137–161. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb04961.x>.
- (4) Welch, R. A. Pore-Forming Cytolysins of Gram-Negative Bacteria. *Mol. Microbiol.* **1991**, *5* (3), 521–528. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb00723.x>.
- (5) Koronakis, V.; Eswaran, J.; Hughes, C. Structure and Function of TolC: The Bacterial Exit Duct for Proteins and Drugs. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73* (1), 467–489. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074104>.
- (6) Venter, H.; Mowla, R.; Ohene-Agyei, T.; Ma, S. RND-Type Drug Efflux Pumps from Gram-Negative Bacteria: Molecular Mechanism and Inhibition. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 377. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00377>.
- (7) Stanley, P.; Koronakis, V.; Hughes, C. Acylation of Escherichia Coli Hemolysin: A Unique Protein Lipidation Mechanism Underlying Toxin Function. *MICROBIOL MOL BIOL REV* **1998**, *62*, 25.
- (8) Masin, J.; Basler, M.; Knapp, O.; El-Azami-El-Idrissi, M.; Maier, E.; Konopasek, I.; Benz, R.; Leclerc, C.; Sebo, P. Acylation of Lysine 860 Allows Tight Binding and Cytotoxicity of Bordetella Adenylate Cyclase on CD11b-Expressing Cells. *Biochemistry* **2005**, *44* (38), 12759–12766. <https://doi.org/10.1021/bi050459b>.
- (9) Gavin, H. E.; Satchell, K. J. F. MARTX Toxins as Effector Delivery Platforms. *Pathog. Dis.* **2015**, *73* (9). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv092>.
- (10) Juranka, P.; Zhang, F.; Kulpa, J.; Endicott, J.; Blight, M.; Holland, I. B.; Ling, V. Characterization of the Hemolysin Transporter, HlyB, Using an Epitope Insertion. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (6), 3764–3770. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50591-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50591-9).
- (11) Fath, M. J.; Kolter, R. ABC Transporters: Bacterial Exporters. *Microbiol. Rev.* **1993**, *57* (4), 995–1017.
- (12) Dinh, T.; Paulsen, I. T.; Saier, M. H. A Family of Extracytoplasmic Proteins That Allow Transport of Large Molecules across the Outer Membranes of Gram-Negative Bacteria. *J. Bacteriol.* **1994**, *176* (13), 3825–3831. <https://doi.org/10.1128/jb.176.13.3825-3831.1994>.
- (13) Schüle, R.; Gentschev, I.; Mollenkopf, H.-J.; Goebel, W. A Topological Model for the Haemolysin Translocator Protein HlyD. *Mol. Gen. Genet. MGG* **1992**, *234* (1), 155–163. <https://doi.org/10.1007/BF00272357>.
- (14) Felmler, T.; Pellett, S.; Welch, R. A. Nucleotide Sequence of an Escherichia Coli Chromosomal Hemolysin. *J. Bacteriol.* **1985**, *163* (1), 94–105.
- (15) Koronakis, V.; Cross, M.; Hughes, C. Expression of the E.Coli Hemolysin Secretion Gene HlyB Involves Transcript Anti-Termination within the Hly Operon. *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16* (11), 4789–4800.
- (16) Gygi, D.; Nicolet, J.; Frey, J.; Cross, M.; Koronakis, V.; Hughes, C. Isolation of the Actinobacillus Pleuropneumoniae Haemolysin Gene and the Activation and Secretion of the Prohaemolysin by the HlyC, HlyB and HlyD Proteins of Escherichia Coli. *Mol. Microbiol.* **1990**, *4* (1), 123–128. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb02021.x>.

- (17) Meier, R.; Drepper, T.; Svensson, V.; Jaeger, K.-E.; Baumann, U. A Calcium-Gated Lid and a Large Beta-Roll Sandwich Are Revealed by the Crystal Structure of Extracellular Lipase from *Serratia Marcescens*. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (43), 31477–31483. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704942200>.
- (18) Linhartová, I.; Bumba, L.; Mašín, J.; Basler, M.; Osička, R.; Kamanová, J.; Procházková, K.; Adkins, I.; Hejnová-Holubová, J.; Sadílková, L.; Morová, J.; Šebo, P. RTX Proteins: A Highly Diverse Family Secreted by a Common Mechanism: RTX Proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* **2010**, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00231.x>.
- (19) Guo, S.; Vance, T. D. R.; Stevens, C. A.; Voets, I.; Davies, P. L. RTX Adhesins Are Key Bacterial Surface Megaproteins in the Formation of Biofilms. *Trends Microbiol.* **2019**, *27* (5), 453–467. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.12.003>.
- (20) Shur, O.; Banta, S. Rearranging and Concatenating a Native RTX Domain to Understand Sequence Modularity. *Protein Eng. Des. Sel.* **2013**, *26* (3), 171–180. <https://doi.org/10.1093/protein/gz092>.
- (21) Baumann, U. Structure–Function Relationships of the Repeat Domains of RTX Toxins. *Toxins* **2019**, *11* (11), 657. <https://doi.org/10.3390/toxins11110657>.
- (22) Baumann, U.; Wu, S.; Flaherty, K. M.; McKay, D. B. Three-Dimensional Structure of the Alkaline Protease of *Pseudomonas Aeruginosa*: A Two-Domain Protein with a Calcium Binding Parallel Beta Roll Motif. *EMBO J.* **1993**, *12* (9), 3357.
- (23) Smith, T. J.; Sondermann, H.; O’Toole, G. A. Type 1 Does the Two-Step: Type 1 Secretion Substrates with a Functional Periplasmic Intermediate. *J. Bacteriol.* *200* (18), e00168-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00168-18>.
- (24) Oresnik, I. J.; Twelker, S.; Hynes, M. F. Cloning and Characterization of a *Rhizobium Leguminosarum* Gene Encoding a Bacteriocin with Similarities to RTX Toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65* (7), 2833–2840. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.7.2833-2840.1999>.
- (25) Gray, L.; Mackman, N.; Nicaud, J. M.; Holland, I. B. The Carboxy-Terminal Region of Haemolysin 2001 Is Required for Secretion of the Toxin from *Escherichia Coli*. *Mol. Gen. Genet. MGG* **1986**, *205* (1), 127–133. <https://doi.org/10.1007/BF02428042>.
- (26) Ginalski, K.; Kinch, L.; Rychlewski, L.; Grishin, N. V. BTLCP Proteins: A Novel Family of Bacterial Transglutaminase-like Cysteine Proteinases. *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29* (8), 392–395. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.06.001>.
- (27) Bumba, L.; Masin, J.; Macek, P.; Wald, T.; Motlova, L.; Bibova, I.; Klimova, N.; Bednarova, L.; Veverka, V.; Kachala, M.; Svergun, D. I.; Barinka, C.; Sebo, P. Calcium-Driven Folding of RTX Domain β -Rolls Ratchets Translocation of RTX Proteins through Type I Secretion Ducts. *Mol. Cell* **2016**, *62* (1), 47–62. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.018>.
- (28) Hamada, K.; Hata, Y.; Katsuya, Y.; Hiramatsu, H.; Fujiwara, T.; Katsube, Y. Crystal Structure of *Serratia* Protease, a Zinc-Dependent Proteinase from *Serratia* Sp. E-15, Containing a β -Sheet Coil Motif at 2.0 Å Resolution. *J. Biochem. (Tokyo)* **1996**, *119* (5), 844–851.
- (29) Miyatake, H.; Hata, Y.; Fujii, T.; Hamada, K.; Morihara, K.; Katsube, Y. Crystal Structure of the Unliganded Alkaline Protease from *Pseudomonas Aeruginosa* IFO3080 and Its Conformational Changes on Ligand Binding. *J. Biochem. (Tokyo)* **1995**, *118* (3), 474–479.
- (30) Baumann, U. Crystal Structure of the 50 KDa Metallo Protease from *Serratia Marcescens*. *J. Mol. Biol.* **1994**, *242* (3), 244–251. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1576>.
- (31) Baumann, U.; Bauer, M.; Létoffé, S.; Delepelaire, P.; Wandersman, C. Crystal Structure of a Complex between *Serratia Marcescens* Metallo-Protease and an Inhibitor from

- Erwinia Chrysanthemi. *J. Mol. Biol.* **1995**, *248* (3), 653–661. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0249>.
- (32) Hege, T.; Feltzer, R. E.; Gray, R. D.; Baumann, U. Crystal Structure of a Complex between Pseudomonas Aeruginosa Alkaline Protease and Its Cognate Inhibitor: INHIBITION BY A ZINC–NH₂ COORDINATIVE BOND *. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (37), 35087–35092. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104020200>.
- (33) Wu, D.; Ran, T.; Wang, W.; Xu, D. Structure of a Thermostable Serralyisin from Serratia Sp. FS14 at 1.1 Å Resolution. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* **2016**, *72* (Pt 1), 10–15. <https://doi.org/10.1107/S2053230X15023092>.
- (34) Hege, T.; Baumann, U. Protease C of Erwinia Chrysanthemi: The Crystal Structure and Role of Amino Acids Y228 and E189. *J. Mol. Biol.* **2001**, *314* (2), 187–193. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5124>.
- (35) Oberholzer, A. E.; Bumann, M.; Hege, T.; Russo, S.; Baumann, U. Metzincin's Canonical Methionine Is Responsible for the Structural Integrity of the Zinc-Binding Site. *Biol. Chem.* **2009**, *390* (9), 875–881. <https://doi.org/10.1515/BC.2009.100>.
- (36) Bharat, T. A. M.; Kureisaite-Ciziene, D.; Hardy, G. G.; Yu, E. W.; Devant, J. M.; Hagen, W. J. H.; Brun, Y. V.; Briggs, J. A. G.; Löwe, J. Structure of the Hexagonal Surface Layer on Caulobacter Crescentus Cells. *Nat. Microbiol.* **2017**, *2*, 17059. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.59>.
- (37) Herrmann, J.; Li, P.-N.; Jabbarpour, F.; Chan, A. C. K.; Rajkovic, I.; Matsui, T.; Shapiro, L.; Smit, J.; Weiss, T. M.; Murphy, M. E. P.; Wakatsuki, S. A Bacterial Surface Layer Protein Exploits Multistep Crystallization for Rapid Self-Assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2020**, *117* (1), 388–394. <https://doi.org/10.1073/pnas.1909798116>.
- (38) Aachmann, F. L.; Svanem, B. I. G.; Güntert, P.; Petersen, S. B.; Valla, S.; Wimmer, R. NMR Structure of the R-Module: A Parallel Beta-Roll Subunit from an Azotobacter Vinelandii Mannuronan C-5 Epimerase. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (11), 7350–7356. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510069200>.
- (39) Buchinger, E.; Knudsen, D. H.; Behrens, M. A.; Pedersen, J. S.; Aarstad, O. A.; Tøndervik, A.; Valla, S.; Skjåk-Bræk, G.; Wimmer, R.; Aachmann, F. L. Structural and Functional Characterization of the R-Modules in Alginate C-5 Epimerases AlgE4 and AlgE6 from Azotobacter Vinelandii. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (45), 31382–31396. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.567008>.
- (40) Motlova, L.; Klimova, N.; Fiser, R.; Sebo, P.; Bumba, L. Continuous Assembly of β -Roll Structures Is Implicated in the Type I-Dependent Secretion of Large Repeat-in-Toxins (RTX) Proteins. *J. Mol. Biol.* **2020**, *432* (20), 5696–5710. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.08.020>.
- (41) Goldsmith, J. A.; DiVenere, A. M.; Maynard, J. A.; McLellan, J. S. Structural Basis for Antibody Binding to Adenylate Cyclase Toxin Reveals RTX Linkers as Neutralization-Sensitive Epitopes. *PLOS Pathog.* **2021**, *17* (9), e1009920. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009920>.
- (42) Angkawidjaja, C.; You, D.; Matsumura, H.; Kuwahara, K.; Koga, Y.; Takano, K.; Kanaya, S. Crystal Structure of a Family I.3 Lipase from Pseudomonas Sp. MIS38 in a Closed Conformation. *FEBS Lett.* **2007**, *581* (26), 5060–5064. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.09.048>.
- (43) Kuwahara, K.; Angkawidjaja, C.; Matsumura, H.; Koga, Y.; Takano, K.; Kanaya, S. Importance of the Ca²⁺-Binding Sites in the N-Catalytic Domain of a Family I.3 Lipase for Activity and Stability. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* **2008**, *21* (12), 737–744. <https://doi.org/10.1093/protein/gzn057>.
- (44) Angkawidjaja, C.; Matsumura, H.; Koga, Y.; Takano, K.; Kanaya, S. X-Ray Crystallographic and MD Simulation Studies on the Mechanism of Interfacial Activation

- of a Family I.3 Lipase with Two Lids. *J. Mol. Biol.* **2010**, *400* (1), 82–95. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.04.051>.
- (45) Aghajari, N.; Van Petegem, F.; Villeret, V.; Chessa, J.-P.; Gerday, C.; Haser, R.; Van Beeumen, J. Crystal Structures of a Psychrophilic Metalloprotease Reveal New Insights into Catalysis by Cold-Adapted Proteases. *Proteins* **2003**, *50* (4), 636–647. <https://doi.org/10.1002/prot.10264>.
- (46) Ravaud, S.; Gouet, P.; Haser, R.; Aghajari, N. Probing the Role of Divalent Metal Ions in a Bacterial Psychrophilic Metalloprotease: Binding Studies of an Enzyme in the Crystalline State by x-Ray Crystallography. *J. Bacteriol.* **2003**, *185* (14), 4195–4203. <https://doi.org/10.1128/JB.185.14.4195-4203.2003>.
- (47) Zhang, S.-C.; Sun, M.; Li, T.; Wang, Q.-H.; Hao, J.-H.; Han, Y.; Hu, X.-J.; Zhou, M.; Lin, S.-X. Structure Analysis of a New Psychrophilic Marine Protease. *PloS One* **2011**, *6* (11), e26939. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026939>.
- (48) Garnham, C. P.; Campbell, R. L.; Davies, P. L. Anchored Clathrate Waters Bind Antifreeze Proteins to Ice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108* (18), 7363–7367. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100429108>.
- (49) Guo, S.; Stevens, C. A.; Vance, T. D. R.; Olijve, L. L. C.; Graham, L. A.; Campbell, R. L.; Yazdi, S. R.; Escobedo, C.; Bar-Dolev, M.; Yashunsky, V.; Braslavsky, I.; Langelaan, D. N.; Smith, S. P.; Allingham, J. S.; Voets, I. K.; Davies, P. L. Structure of a 1.5-MDa Adhesin That Binds Its Antarctic Bacterium to Diatoms and Ice. *Sci. Adv.* **2017**, *3* (8), e1701440. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1701440>.
- (50) von Kügelgen, A.; Tang, H.; Hardy, G. G.; Kureisaite-Ciziene, D.; Brun, Y. V.; Stansfeld, P. J.; Robinson, C. V.; Bharat, T. A. M. In Situ Structure of an Intact Lipopolysaccharide-Bound Bacterial Surface Layer. *Cell* **2020**, *180* (2), 348–358.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.006>.
- (51) The UniProt Consortium. UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49* (D1), D480–D489. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>.
- (52) Bauche, C. Structural and Functional Characterization of an Essential RTX Subdomain of Bordetella Pertussis Adenylate Cyclase Toxin. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (25), 16914–16926. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601594200>.
- (53) Sotomayor Pérez, A.-C.; Karst, J. C.; Davi, M.; Guijarro, J. I.; Ladant, D.; Chenal, A. Characterization of the Regions Involved in the Calcium-Induced Folding of the Intrinsically Disordered RTX Motifs from the Bordetella Pertussis Adenylate Cyclase Toxin. *J. Mol. Biol.* **2010**, *397* (2), 534–549. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.01.031>.
- (54) Iwaki, M.; Ullmann, A.; Sebo, P. Identification by in Vitro Complementation of Regions Required for Cell-Invasive Activity of Bordetella Pertussis Adenylate Cyclase Toxin. *Mol. Microbiol.* **1995**, *17* (6), 1015–1024. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17061015.x.
- (55) Lilie, H.; Haehnel, W.; Rudolph, R.; Baumann, U. Folding of a Synthetic Parallel β -Roll Protein. *FEBS Lett.* **2000**, *470* (2), 173–177. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01308-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01308-9).
- (56) Gilbert, J. A.; Davies, P. L.; Laybourn-Parry, J. A Hyperactive, Ca²⁺-Dependent Antifreeze Protein in an Antarctic Bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *245* (1), 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.022>.
- (57) Mortimer, E. A.; Jones, P. K. An Evaluation of Pertussis Vaccine. *Rev. Infect. Dis.* **1979**, *1* (6), 927–934. <https://doi.org/10.1093/clinids/1.6.927>.
- (58) Chow, M. Y. K.; Khandaker, G.; McIntyre, P. Global Childhood Deaths From Pertussis: A Historical Review. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2016**, *63* (Suppl 4), S134–S141. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw529>.
- (59) The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1919

- <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1919/bordet/biographical/> (accessed 2021 - 10 -11).
- (60) Kuchar, E.; Karlikowska-Skwarnik, M.; Han, S.; Nitsch-Osuch, A. Pertussis: History of the Disease and Current Prevention Failure. In *Pulmonary Dysfunction and Disease*; Pokorski, M., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 77–82. https://doi.org/10.1007/5584_2016_21.
- (61) ČR, Ú. hexavakcína | NZIP <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/216> (accessed 2021 - 10 -12).
- (62) Fanget, N. Pertussis: A Tale of Two Vaccines. *Nat. Res.* **2020**. <https://doi.org/10.1038/d42859-020-00013-8>.
- (63) Weiss, A. A.; Hewlett, E. L.; Myers, G. A.; Falkow, S. Tn5-Induced Mutations Affecting Virulence Factors of Bordetella Pertussis. *Infect. Immun.* **1983**, *42* (1), 33–41.
- (64) Morse, S. I.; Morse, J. H. Isolation and Properties of the Leukocytosis- and Lymphocytosis-Promoting Factor of Bordetella Pertussis. *J. Exp. Med.* **1976**, *143* (6), 1483–1502. <https://doi.org/10.1084/jem.143.6.1483>.
- (65) Walker, K. E.; Weiss, A. A. Characterization of the Dermonecrotic Toxin in Members of the Genus Bordetella. *Infect. Immun.* **1994**, *62* (9), 3817–3828. <https://doi.org/10.1128/iai.62.9.3817-3828.1994>.
- (66) Tuomanen, E. Piracy of Adhesins: Attachment of Superinfecting Pathogens to Respiratory Cilia by Secreted Adhesins of Bordetella Pertussis. *Infect. Immun.* **1986**, *54* (3), 905–908. <https://doi.org/10.1128/iai.54.3.905-908.1986>.
- (67) Inatsuka, C. S.; Xu, Q.; Vujkovic-Cvijin, I.; Wong, S.; Stibitz, S.; Miller, J. F.; Cotter, P. A. Pertactin Is Required for Bordetella Species To Resist Neutrophil-Mediated Clearance. *Infect. Immun.* **2010**, *78* (7), 2901–2909. <https://doi.org/10.1128/IAI.00188-10>.
- (68) Heck, D. V.; Trus, B. L.; Steven, A. C. Three-Dimensional Structure of Bordetella Pertussis Fimbriae. *J. Struct. Biol.* **1996**, *116* (2), 264–269. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1996.0041>.
- (69) Smith, A. M.; Guzmán, C. A.; Walker, M. J. The Virulence Factors of Bordetella Pertussis: A Matter of Control. *FEMS Microbiol. Rev.* **2001**, *25* (3), 309–333. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00580.x>.
- (70) Goldman, W. E.; Cookson, B. T. Structure and Functions of the Bordetella Tracheal Cytotoxin. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* **1988**, *13 Suppl*, 187–191.
- (71) Mikelova, L. K.; Halperin, S. A.; Scheifele, D.; Smith, B.; Ford-Jones, E.; Vaudry, W.; Jadavji, T.; Law, B.; Moore, D.; Members of the Immunization Monitoring Program, Active (IMPACT). Predictors of Death in Infants Hospitalized with Pertussis: A Case-Control Study of 16 Pertussis Deaths in Canada. *J. Pediatr.* **2003**, *143* (5), 576–581. [https://doi.org/10.1067/S0022-3476\(03\)00365-2](https://doi.org/10.1067/S0022-3476(03)00365-2).
- (72) Trollfors, B.; Taranger, J.; Lagergård, T.; Lind, L.; Sundh, V.; Zackrisson, G.; Lowe, C. U.; Blackwelder, W.; Robbins, J. B. A Placebo-Controlled Trial of a Pertussis-Toxoid Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **1995**, *333* (16), 1045–1050. <https://doi.org/10.1056/NEJM199510193331604>.
- (73) Verma, A.; Burns, D. L. Requirements for Assembly of PtlH with the Pertussis Toxin Transporter Apparatus of Bordetella Pertussis. *Infect. Immun.* **2007**, *75* (5), 2297–2306. <https://doi.org/10.1128/IAI.00008-07>.
- (74) Witvliet, M. H.; Burns, D. L.; Brennan, M. J.; Poolman, J. T.; Manclark, C. R. Binding of Pertussis Toxin to Eucaryotic Cells and Glycoproteins. *Infect. Immun.* **1989**, *57* (11), 3324–3330. <https://doi.org/10.1128/iai.57.11.3324-3330.1989>.
- (75) Sugimoto, N.; Takuwa, N.; Okamoto, H.; Sakurada, S.; Takuwa, Y. Inhibitory and Stimulatory Regulation of Rac and Cell Motility by the G12/13-Rho and Gi Pathways

- Integrated Downstream of a Single G Protein-Coupled Sphingosine-1-Phosphate Receptor Isoform. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23* (5), 1534–1545. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.5.1534-1545.2003>.
- (76) Vojtova, J.; Kamanova, J.; Sebo, P. Bordetella Adenylate Cyclase Toxin: A Swift Saboteur of Host Defense. *Curr. Opin. Microbiol.* **2006**, *9* (1), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.12.011>.
- (77) Novak, J.; Cerny, O.; Osickova, A.; Linhartova, I.; Masin, J.; Bumba, L.; Sebo, P.; Osicka, R. Structure-Function Relationships Underlying the Capacity of Bordetella Adenylate Cyclase Toxin to Disarm Host Phagocytes. *Toxins* **2017**, *9* (10), E300. <https://doi.org/10.3390/toxins9100300>.
- (78) Khelef, N.; Sakamoto, H.; Guiso, N. Both Adenylate Cyclase and Hemolytic Activities Are Required by Bordetella Pertussis to Initiate Infection. *Microb. Pathog.* **1992**, *12* (3), 227–235. [https://doi.org/10.1016/0882-4010\(92\)90057-U](https://doi.org/10.1016/0882-4010(92)90057-U).
- (79) Rose, T.; Sebo, P.; Bellalou, J.; Ladant, D. Interaction of Calcium with Bordetella Pertussis Adenylate Cyclase Toxin: CHARACTERIZATION OF MULTIPLE CALCIUM-BINDING SITES AND CALCIUM-INDUCED CONFORMATIONAL CHANGES (*). *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (44), 26370–26376. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.44.26370>.
- (80) Guo, Q.; Shen, Y.; Lee, Y.-S.; Gibbs, C. S.; Mrksich, M.; Tang, W.-J. Structural Basis for the Interaction of Bordetella Pertussis Adenylate Cyclase Toxin with Calmodulin. *EMBO J.* **2005**, *24* (18), 3190–3201. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600800>.
- (81) Osickova, A.; Masin, J.; Fayolle, C.; Krusek, J.; Basler, M.; Pospisilova, E.; Leclerc, C.; Osicka, R.; Sebo, P. Adenylate Cyclase Toxin Translocates across Target Cell Membrane without Forming a Pore. *Mol. Microbiol.* **2010**, *75* (6), 1550–1562. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07077.x>.
- (82) Fiser, R.; Masin, J.; Bumba, L.; Pospisilova, E.; Fayolle, C.; Basler, M.; Sadilkova, L.; Adkins, I.; Kamanova, J.; Cerny, J.; Konopasek, I.; Osicka, R.; Leclerc, C.; Sebo, P. Calcium Influx Rescues Adenylate Cyclase-Hemolysin from Rapid Cell Membrane Removal and Enables Phagocyte Permeabilization by Toxin Pores. *PLoS Pathog.* **2012**, *8* (4), e1002580. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002580>.
- (83) Vojtova-Vodolanova, J.; Basler, M.; Osicka, R.; Knapp, O.; Maier, E.; Cerny, J.; Benada, O.; Benz, R.; Sebo, P. Oligomerization Is Involved in Pore Formation by Bordetella Adenylate Cyclase Toxin. *FASEB J.* **2009**, *23* (9), 2831–2843. <https://doi.org/10.1096/fj.09-131250>.
- (84) Knapp, O.; Benz, R. Membrane Activity and Channel Formation of the Adenylate Cyclase Toxin (CyaA) of Bordetella Pertussis in Lipid Bilayer Membranes. *Toxins* **2020**. <https://doi.org/10.3390/toxins12030169>.
- (85) Sharara, S. L.; Tayyar, R.; Kanafani, Z. A.; Kanj, S. S. HACEK Endocarditis: A Review. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2016**, *14* (6), 539–545. <https://doi.org/10.1080/14787210.2016.1184085>.
- (86) Ambrosioni, J.; Martinez-Garcia, C.; Llopis, J.; Garcia-de-la-Maria, C.; Hernández-Meneses, M.; Tellez, A.; Falces, C.; Almela, M.; Vidal, B.; Sandoval, E.; Fuster, D.; Quintana, E.; Tolosana, J. M.; Marco, F.; Moreno, A.; Miró, J. M.; Hospital Clinic Infective Endocarditis Investigators. HACEK Infective Endocarditis: Epidemiology, Clinical Features, and Outcome: A Case-Control Study. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* **2018**, *76*, 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.08.013>.
- (87) Meyer, D. J.; Gerding, D. N. Favorable Prognosis of Patients with Prosthetic Valve Endocarditis Caused by Gram-Negative Bacilli of the HACEK Group. *Am. J. Med.* **1988**, *85* (1), 104–107. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(88\)90512-8](https://doi.org/10.1016/0002-9343(88)90512-8).
- (88) Lally, E. T.; Kieba, I. R.; Sato, A.; Green, C. L.; Rosenbloom, J.; Korostoff, J.; Wang, J.

- F.; Shenker, B. J.; Ortlepp, S.; Robinson, M. K.; Billings, P. C. RTX Toxins Recognize a Beta2 Integrin on the Surface of Human Target Cells. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (48), 30463–30469. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.48.30463>.
- (89) Kaur, M.; Kachlany, S. C. Aggregatibacter Actinomycetemcomitans Leukotoxin (LtxA; Leukothera) Induces Cofilin Dephosphorylation and Actin Depolymerization during Killing of Malignant Monocytes. *Microbiology* **2014**, *160* (Pt 11), 2443–2452. <https://doi.org/10.1099/mic.0.082347-0>.
- (90) DiFranco, K. M.; Gupta, A.; Galusha, L. E.; Perez, J.; Nguyen, T.-V. K.; Fineza, C. D.; Kachlany, S. C. Leukotoxin (Leukothera®) Targets Active Leukocyte Function Antigen-1 (LFA-1) Protein and Triggers a Lysosomal Mediated Cell Death Pathway. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (21), 17618–17627. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.314674>.
- (91) Balashova, N. V.; Shah, C.; Patel, J. K.; Megalla, S.; Kachlany, S. C. Aggregatibacter Actinomycetemcomitans LtxC Is Required for Leukotoxin Activity and Initial Interaction between Toxin and Host Cells. *Gene* **2009**, *443* (1–2), 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2009.05.002>.
- (92) Vega, B. A.; Belinka Jr., B. A.; Kachlany, S. C. Aggregatibacter Actinomycetemcomitans Leukotoxin (LtxA; Leukothera®): Mechanisms of Action and Therapeutic Applications. *Toxins* **2019**, *11* (9), 489. <https://doi.org/10.3390/toxins11090489>.
- (93) Kamp, E. M.; Popma, J. K.; Anakotta, J.; Smits, M. A. Identification of Hemolytic and Cytotoxic Proteins of Actinobacillus Pleuropneumoniae by Use of Monoclonal Antibodies. *Infect. Immun.* **1991**, *59* (9), 3079–3085. <https://doi.org/10.1128/iai.59.9.3079-3085.1991>.
- (94) Jansen, R.; Briaire, J.; Kamp, E. M.; Gielkens, A. L.; Smits, M. A. Structural Analysis of the Actinobacillus Pleuropneumoniae-RTX-Toxin I (ApxI) Operon. *Infect. Immun.* **1993**, *61* (9), 3688–3695.
- (95) Frey, J.; Bosse, J. T.; Chang, Y.-F.; Cullen, J. M.; Fenwick, B.; Gerlach, G. F.; Gygi, D.; Haesebrouck, F.; Inzana, T. J.; Jansen, R.; Kamp, E. M.; Macdonald, J.; MacInnes, J. I.; Mittal, K. R.; Nicolet, J.; Rycroft, A. N.; Segers, R. P. A. M.; Smits, M. A.; Stenbaek, E.; Struck, D. K.; van den Bosch, J. F.; Willson, P. J.; Young, R. Y. 1993. Actinobacillus Pleuropneumoniae RTX-Toxins: Uniform Designation of Haemolysins, Cytolysins, Pleurotoxin and Their Genes. *Microbiology* *139* (8), 1723–1728. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-8-1723>.
- (96) Wiles, T. J.; Mulvey, M. A. The RTX Pore-Forming Toxin α -Hemolysin of Uropathogenic Escherichia Coli: Progress and Perspectives. *Future Microbiol.* **2013**, *8* (1), 73–84. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.131>.
- (97) Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72* (1–2), 248–254. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- (98) Lesley, S. A.; Wilson, I. A. Protein Production and Crystallization at the Joint Center for Structural Genomics. *J. Struct. Funct. Genomics* **2005**, *6* (2–3), 71–79. <https://doi.org/10.1007/s10969-005-2897-2>.
- (99) Gorrec, F. The MORPHEUS Protein Crystallization Screen. *J. Appl. Crystallogr.* **2009**, *42* (6), 1035–1042. <https://doi.org/10.1107/S0021889809042022>.
- (100) Grimm, C.; Chari, A.; Reuter, K.; Fischer, U. A Crystallization Screen Based on Alternative Polymeric Precipitants. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66* (Pt 6), 685–697. <https://doi.org/10.1107/S0907444910009005>.
- (101) Leslie, A. G. W. The Integration of Macromolecular Diffraction Data. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2006**, *62* (1), 48–57. <https://doi.org/10.1107/S0907444905039107>.
- (102) Batty, T. G. G.; Kontogiannis, L.; Johnson, O.; Powell, H. R.; Leslie, A. G. W. IMOSFLM: A New Graphical Interface for Diffraction-Image Processing with

- MOSFLM. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67* (Pt 4), 271–281. <https://doi.org/10.1107/S0907444910048675>.
- (103) Krug, M.; Weiss, M. S.; Heinemann, U.; Mueller, U. It XDSAPP: A Graphical User Interface for the Convenient Processing of Diffraction Data Using It XDS. *J. Appl. Crystallogr.* **2012**, *45* (3), 568–572. <https://doi.org/10.1107/S0021889812011715>.
- (104) McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C.; Read, R. J. Phaser Crystallographic Software. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40* (Pt 4), 658–674. <https://doi.org/10.1107/S0021889807021206>.
- (105) Navaza, J. Collaborative Computational Project, Number 4. The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallogr A* **1994**, *50*, 760–763.
- (106) Potterton, E.; Briggs, P.; Turkenburg, M.; Dodson, E. A Graphical User Interface to the CCP4 Program Suite. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2003**, *59* (Pt 7), 1131–1137. <https://doi.org/10.1107/s0907444903008126>.
- (107) Winn, M. D.; Ballard, C. C.; Cowtan, K. D.; Dodson, E. J.; Emsley, P.; Evans, P. R.; Keegan, R. M.; Krissinel, E. B.; Leslie, A. G. W.; McCoy, A.; McNicholas, S. J.; Murshudov, G. N.; Pannu, N. S.; Potterton, E. A.; Powell, H. R.; Read, R. J.; Vagin, A.; Wilson, K. S. Overview of the CCP4 Suite and Current Developments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67* (Pt 4), 235–242. <https://doi.org/10.1107/S0907444910045749>.
- (108) Morris, R. J.; Perrakis, A.; Lamzin, V. S. It ARP/It WARP's Model-Building Algorithms. I. The Main Chain. *Acta Crystallogr. Sect. D* **2002**, *58* (6 Part 2), 968–975. <https://doi.org/10.1107/S0907444902005462>.
- (109) Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. Features and Development of It Coot. *Acta Crystallogr. Sect. D* **2010**, *66* (4), 486–501. <https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>.
- (110) Murshudov, G. N.; Skubák, P.; Lebedev, A. A.; Pannu, N. S.; Steiner, R. A.; Nicholls, R. A.; Winn, M. D.; Long, F.; Vagin, A. A. It REFMAC5 for the Refinement of Macromolecular Crystal Structures. *Acta Crystallogr. Sect. D* **2011**, *67* (4), 355–367. <https://doi.org/10.1107/S0907444911001314>.
- (111) Chen, V. B.; Arendall, W. B.; Headd, J. J.; Keedy, D. A.; Immormino, R. M.; Kapral, G. J.; Murray, L. W.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. MolProbity: All-Atom Structure Validation for Macromolecular Crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66* (Pt 1), 12–21. <https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>.
- (112) Berman, H.; Henrick, K.; Nakamura, H. Announcing the Worldwide Protein Data Bank. *Nat Struct Mol Biol* **2003**, *10* (12), 980–980. <https://doi.org/10.1038/nsb1203-980>.
- (113) Dooley, K.; Kim, Y. H.; Lu, H. D.; Tu, R.; Banta, S. Engineering of an Environmentally Responsive Beta Roll Peptide for Use As a Calcium-Dependent Cross-Linking Domain for Peptide Hydrogel Formation. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (6), 1758–1764. <https://doi.org/10.1021/bm3002446>.
- (114) *The PyMOL Molecular Graphics System*; Schrödinger, LLC., 2015.
- (115) Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G. Clustal W and Clustal X Version 2.0. *Bioinformatics* **2007**, *23* (21), 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>.
- (116) Biasini, M.; Bienert, S.; Waterhouse, A.; Arnold, K.; Studer, G.; Schmidt, T.; Kiefer, F.; Cassarino, T. G.; Bertoni, M.; Bordoli, L.; Schwede, T. SWISS-MODEL: Modelling Protein Tertiary and Quaternary Structure Using Evolutionary Information. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42* (W1), W252–W258. <https://doi.org/10.1093/nar/gku340>.
- (117) Arnold, K.; Bordoli, L.; Kopp, J.; Schwede, T. The SWISS-MODEL Workspace: A Web-Based Environment for Protein Structure Homology Modelling. *Bioinformatics*

- 2006, 22 (2), 195–201. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti770>.
- (118) Bordoli, L.; Kiefer, F.; Arnold, K.; Benkert, P.; Battey, J.; Schwede, T. Protein Structure Homology Modeling Using SWISS-MODEL Workspace. *Nat. Protoc.* **2008**, *4* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.197>.
- (119) Stein, N. CHAINSAW: A Program for Mutating Pdb Files Used as Templates in Molecular Replacement. *J. Appl. Crystallogr.* **2008**, *41* (3), 641–643. <https://doi.org/10.1107/S0021889808006985>.
- (120) Webb, B.; Sali, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER: Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. In *Current Protocols in Bioinformatics*; Bateman, A., Pearson, W. R., Stein, L. D., Stormo, G. D., Yates, J. R., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2016; p 5.6.1–5.6.37. <https://doi.org/10.1002/cpbi.3>.
- (121) Osička, R.; Osičková, A.; Basar, T.; Guermonprez, P.; Rojas, M.; Leclerc, C.; Šebo, P. Delivery of CD8+ T-Cell Epitopes into Major Histocompatibility Complex Class I Antigen Presentation Pathway by Bordetella Pertussis Adenylate Cyclase: Delineation of Cell Invasive Structures and Permissive Insertion Sites. *Infect. Immun.* **2000**, *68* (1), 247–256.
- (122) Rhodes, C. R.; Gray, M. C.; Watson, J. M.; Muratore, T. L.; Kim, S. B.; Hewlett, E. L.; Grisham, C. M. Structural Consequences of Divalent Metal Binding by the Adenylate Cyclase Toxin of Bordetella Pertussis. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *395* (2), 169–176. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2553>.
- (123) Espinosa-Vinals, C. A.; Masin, J.; Holubova, J.; Stanek, O.; Jurnecka, D.; Osicka, R.; Sebo, P.; Bumba, L. Almost Half of the RTX Domain Is Dispensable for Complement Receptor 3 Binding and Cell-Invasive Activity of the Bordetella Adenylate Cyclase Toxin. *J. Biol. Chem.* **2021**, *297* (1), 100833. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100833>.
- (124) Blenner, M. A.; Shur, O.; Szilvay, G. R.; Cropek, D. M.; Banta, S. Calcium-Induced Folding of a Beta Roll Motif Requires C-Terminal Entropic Stabilization. *J. Mol. Biol.* **2010**, *400* (2), 244–256. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.04.056>.
- (125) Woida, P. J.; Satchell, K. J. F. Coordinated Delivery and Function of Bacterial MARTX Toxin Effectors. *Mol. Microbiol.* **2018**, *107* (2), 133–141. <https://doi.org/10.1111/mmi.13875>.
- (126) Sukova, A.; Bumba, L.; Srb, P.; Veverka, V.; Stanek, O.; Holubova, J.; Chmelik, J.; Fiser, R.; Sebo, P.; Masin, J. Negative Charge of the AC-to-Hly Linking Segment Modulates Calcium-Dependent Membrane Activities of Bordetella Adenylate Cyclase Toxin. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2020**, *1862* (9), 183310. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183310>.
- (127) Lenders, M. H. H.; Reimann, S.; Smits, S. H. J.; Schmitt, L. Molecular Insights into Type I Secretion Systems. *Biol. Chem.* **2013**, *394* (11). <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0171>.
- (128) Nakajima, R.; Nováková, Z.; Tueckmantel, W.; Motlová, L.; Bařinka, C.; Kozikowski, A. P. 2-Aminoadipic Acid-C(O)-Glutamate Based Prostate-Specific Membrane Antigen Ligands for Potential Use as Theranostics. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9* (11), 1099–1104. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.8b00318>.
- (129) Ghosh, A.; Heston, W. D. W. Tumor Target Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA) and Its Regulation in Prostate Cancer. *J. Cell. Biochem.* **2004**, *91* (3), 528–539. <https://doi.org/10.1002/jcb.10661>.
- (130) Mhaweche-Fauceglia, P.; Zhang, S.; Terracciano, L.; Sauter, G.; Chadhuri, A.; Herrmann, F. R.; Penetrante, R. Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) Protein Expression in Normal and Neoplastic Tissues and Its Sensitivity and Specificity in Prostate Adenocarcinoma: An Immunohistochemical Study Using Multiple Tumour

- Tissue Microarray Technique. *Histopathology* **2007**, *50* (4), 472–483. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2007.02635.x>.
- (131) Sanchez-Crespo, A. Comparison of Gallium-68 and Fluorine-18 Imaging Characteristics in Positron Emission Tomography. *Appl. Radiat. Isot. Data Instrum. Methods Use Agric. Ind. Med.* **2013**, *76*, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2012.06.034>.
- (132) Barinka, C.; Novakova, Z.; Hin, N.; Bím, D.; Ferraris, D. V.; Duvall, B.; Kabarriti, G.; Tsukamoto, R.; Budesinsky, M.; Motlova, L.; Rojas, C.; Slusher, B. S.; Rokob, T. A.; Rulišek, L.; Tsukamoto, T. Structural and Computational Basis for Potent Inhibition of Glutamate Carboxypeptidase II by Carbamate-Based Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27* (2), 255–264. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.11.022>.
- (133) Evans, J. C.; Malhotra, M.; Cryan, J. F.; O’Driscoll, C. M. The Therapeutic and Diagnostic Potential of the Prostate Specific Membrane Antigen/Glutamate Carboxypeptidase II (PSMA/GCPII) in Cancer and Neurological Disease. *Br. J. Pharmacol.* **2016**, *173* (21), 3041–3079. <https://doi.org/10.1111/bph.13576>.
- (134) Zhang, W.; Murakawa, Y.; Wozniak, K. M.; Slusher, B.; Sima, A. A. F. The Preventive and Therapeutic Effects of GCPII (NAALADase) Inhibition on Painful and Sensory Diabetic Neuropathy. *J. Neurol. Sci.* **2006**, *247* (2), 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2006.05.052>.
- (135) Bařinka, C.; Rojas, C.; Slusher, B.; Pomper, M. Glutamate Carboxypeptidase II in Diagnosis and Treatment of Neurologic Disorders and Prostate Cancer. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19* (6), 856–870.
- (136) Deb, N.; Goris, M.; Trisler, K.; Fowler, S.; Saal, J.; Ning, S.; Becker, M.; Marquez, C.; Knox, S. Treatment of Hormone-Refractory Prostate Cancer with 90Y-CYT-356 Monoclonal Antibody. *Clin. Cancer Res.* **1996**, *2* (8), 1289–1297.
- (137) Rais, R.; Jiang, W.; Zhai, H.; Wozniak, K. M.; Stathis, M.; Hollinger, K. R.; Thomas, A. G.; Rojas, C.; Vornov, J. J.; Marohn, M.; Li, X.; Slusher, B. S. FOLH1/GCPII Is Elevated in IBD Patients, and Its Inhibition Ameliorates Murine IBD Abnormalities. *JCI Insight* *1* (12), e88634. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.88634>.
- (138) Date, A. A.; Rais, R.; Babu, T.; Ortiz, J.; Kanvinde, P.; Thomas, A. G.; Zimmermann, S. C.; Gadiano, A. J.; Halpert, G.; Slusher, B. S.; Ensign, L. M. Local Enema Treatment to Inhibit FOLH1/GCPII as a Novel Therapy for Inflammatory Bowel Disease. *J. Controlled Release* **2017**, *263*, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.01.036>.
- (139) Yang, X.; Mease, R. C.; Pullambhatla, M.; Lisok, A.; Chen, Y.; Foss, C. A.; Wang, Y.; Shallal, H.; Edelman, H.; Hoyer, A. T.; Attardo, G.; Nimmagadda, S.; Pomper, M. G. [18F]Fluorobenzoyllysinepentanedioic Acid Carbamates: New Scaffolds for Positron Emission Tomography (PET) Imaging of Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA). *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (1), 206–218. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01268>.
- (140) Kim, K.; Kwon, H.; Barinka, C.; Motlova, L.; Nam, S.; Choi, D.; Ha, H.; Nam, H.; Son, S.-H.; Minn, I.; Pomper, M. G.; Yang, X.; Kutil, Z.; Byun, Y. Novel β - and γ -Amino Acid-Derived Inhibitors of Prostate-Specific Membrane Antigen. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (6), 3261–3273. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b02022>.
- (141) Chang, A. J.; Autio, K. A.; Roach, M.; Scher, H. I. “High-Risk” Prostate Cancer: Classification and Therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2014**, *11* (6), 308–323. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.68>.
- (142) Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2020. *CA. Cancer J. Clin.* **2020**, *70* (1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>.
- (143) Bostwick, D. G.; Pacelli, A.; Blute, M.; Roche, P.; Murphy, G. P. Prostate Specific Membrane Antigen Expression in Prostatic Intraepithelial Neoplasia and Adenocarcinoma: A Study of 184 Cases. *Cancer* **1998**, *82* (11), 2256–2261.

- [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19980601\)82:11<2256::aid-cncr22>3.0.co;2-s](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19980601)82:11<2256::aid-cncr22>3.0.co;2-s).
- (144) Kozikowski, A. P.; Nan, F.; Conti, P.; Zhang, J.; Ramadan, E.; Bzdega, T.; Wroblewska, B.; Neale, J. H.; Pshenichkin, S.; Wroblewski, J. T. Design of Remarkably Simple, Yet Potent Urea-Based Inhibitors of Glutamate Carboxypeptidase II (NAALADase). *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (3), 298–301. <https://doi.org/10.1021/jm000406m>.
- (145) Chen, Y.; Pullambhatla, M.; Foss, C. A.; Byun, Y.; Nimmagadda, S.; Senthamizchelvan, S.; Sgouros, G.; Mease, R. C.; Pomper, M. G. 2-(3-{1-Carboxy-5-[(6-[18F]Fluoro-Pyridine-3-Carbonyl)-Amino]-Pentyl}-Ureido)-Pentanedioic Acid, [18F]DCFPyL, a PSMA-Based PET Imaging Agent for Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2011**, *17* (24), 7645–7653. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1357>.
- (146) Shen, S.; Svoboda, M.; Zhang, G.; Cavašin, M. A.; Motlova, L.; McKinsey, T. A.; Eubanks, J. H.; Bařinka, C.; Kozikowski, A. P. Structural and in Vivo Characterization of Tubastatin A, a Widely Used Histone Deacetylase 6 Inhibitor. *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11* (5), 706–712. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00560>.
- (147) Verdin, E.; Dequiedt, F.; Kasler, H. G. Class II Histone Deacetylases: Versatile Regulators. *Trends Genet.* **2003**, *19* (5), 286–293. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00073-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00073-8).
- (148) Hubbert, C.; Guardiola, A.; Shao, R.; Kawaguchi, Y.; Ito, A.; Nixon, A.; Yoshida, M.; Wang, X.-F.; Yao, T.-P. HDAC6 Is a Microtubule-Associated Deacetylase. *Nature* **2002**, *417* (6887), 455–458. <https://doi.org/10.1038/417455a>.
- (149) Zhang, Y.; Kwon, S.; Yamaguchi, T.; Cubizolles, F.; Rousseaux, S.; Kneissel, M.; Cao, C.; Li, N.; Cheng, H.-L.; Chua, K.; Lombard, D.; Mizeracki, A.; Matthias, G.; Alt, F. W.; Khochbin, S.; Matthias, P. Mice Lacking Histone Deacetylase 6 Have Hyperacetylated Tubulin but Are Viable and Develop Normally. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28* (5), 1688–1701. <https://doi.org/10.1128/MCB.01154-06>.
- (150) Kozlov, M. V.; Kleymenova, A. A.; Konduktorov, K. A.; Malikova, A. Z.; Kochetkov, S. N. Selective Inhibitor of Histone Deacetylase 6 (Tubastatin A) Suppresses Proliferation of Hepatitis C Virus Replicon in Culture of Human Hepatocytes. *Biochem. Biokhimiia* **2014**, *79* (7), 637–642. <https://doi.org/10.1134/S0006297914070050>.
- (151) Majid, T.; Griffin, D.; Criss, Z.; Jarpe, M.; Pautler, R. G. Pharmacologic Treatment with Histone Deacetylase 6 Inhibitor (ACY-738) Recovers Alzheimer’s Disease Phenotype in Amyloid Precursor Protein/Presenilin 1 (APP/PS1) Mice. *Alzheimers Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **2015**, *1* (3), 170–181. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2015.08.001>.
- (152) Benoy, V.; Van Helleputte, L.; Prior, R.; d’Ydewalle, C.; Haeck, W.; Geens, N.; Scheveneels, W.; Schevenels, B.; Cader, M. Z.; Talbot, K.; Kozikowski, A. P.; Vanden Berghe, P.; Van Damme, P.; Robberecht, W.; Van Den Bosch, L. HDAC6 Is a Therapeutic Target in Mutant GARS-Induced Charcot-Marie-Tooth Disease. *Brain* **2018**, *141* (3), 673–687. <https://doi.org/10.1093/brain/awx375>.
- (153) Guo, W.; Naujock, M.; Fumagalli, L.; Vandoorne, T.; Baatsen, P.; Boon, R.; Ordovás, L.; Patel, A.; Welters, M.; Vanwelden, T.; Geens, N.; Tricot, T.; Benoy, V.; Steyaert, J.; Lefebvre-Omar, C.; Boesmans, W.; Jarpe, M.; Sternecker, J.; Wegner, F.; Petri, S.; Bohl, D.; Vanden Berghe, P.; Robberecht, W.; Van Damme, P.; Verfaillie, C.; Van Den Bosch, L. HDAC6 Inhibition Reverses Axonal Transport Defects in Motor Neurons Derived from FUS-ALS Patients. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 861. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00911-y>.
- (154) Xu, X.; Kozikowski, A. P.; Pozzo-Miller, L. A Selective Histone Deacetylase-6 Inhibitor Improves BDNF Trafficking in Hippocampal Neurons from Mecp2 Knockout Mice: Implications for Rett Syndrome. *Front. Cell. Neurosci.* **2014**, *8*, 68.

- <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00068>.
- (155) Butler, K. V.; Kalin, J.; Brochier, C.; Vistoli, G.; Langley, B.; Kozikowski, A. P. Rational Design and Simple Chemistry Yield a Superior, Neuroprotective HDAC6 Inhibitor, Tubastatin A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (31), 10842–10846. <https://doi.org/10.1021/ja102758v>.
- (156) Ptacek, J.; Zhang, D.; Qiu, L.; Kruspe, S.; Motlova, L.; Kolenko, P.; Novakova, Z.; Shubham, S.; Havlinova, B.; Baranova, P.; Chen, S.-J.; Zou, X.; Giangrande, P.; Barinka, C. Structural Basis of Prostate-Specific Membrane Antigen Recognition by the A9g RNA Aptamer. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48* (19), 11130–11145. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa494>.
- (157) Horoszewicz, J. S.; Kawinski, E.; Murphy, G. P. Monoclonal Antibodies to a New Antigenic Marker in Epithelial Prostatic Cells and Serum of Prostatic Cancer Patients. *Anticancer Res.* **1987**, *7* (5B), 927–935.
- (158) Ellis, R. J.; Kaminsky, D. A.; Zhou, E. H.; Fu, P.; Chen, W.-D.; Brelin, A.; Faulhaber, P. F.; Bodner, D. Ten-Year Outcomes: The Clinical Utility of Single Photon Emission Computed Tomography/Computed Tomography Capromab Pendetide (Prostascint) in a Cohort Diagnosed with Localized Prostate Cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2011**, *81* (1), 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.05.053>.
- (159) Barinka, C.; Ptacek, J.; Richter, A.; Novakova, Z.; Morath, V.; Skerra, A. Selection and Characterization of Anticalins Targeting Human Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA). *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* **2016**, *29* (3), 105–115. <https://doi.org/10.1093/protein/gzv065>.
- (160) Neburkova, J.; Sedlak, F.; Zackova Suchanova, J.; Kostka, L.; Sacha, P.; Subr, V.; Etrych, T.; Simon, P.; Barinkova, J.; Krystufek, R.; Spanielova, H.; Forstova, J.; Konvalinka, J.; Cigler, P. Inhibitor-GCPII Interaction: Selective and Robust System for Targeting Cancer Cells with Structurally Diverse Nanoparticles. *Mol. Pharm.* **2018**, *15* (8), 2932–2945. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00889>.
- (161) Maresca, K. P.; Hillier, S. M.; Lu, G.; Marquis, J. C.; Zimmerman, C. N.; Eckelman, W. C.; Joyal, J. L.; Babich, J. W. Small Molecule Inhibitors of PSMA Incorporating Technetium-99m for Imaging Prostate Cancer: Effects of Chelate Design on Pharmacokinetics. *Inorganica Chim. Acta* **2012**, *389*, 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2012.03.002>.
- (162) Bayat, P.; Nosrati, R.; Alibolandi, M.; Rafatpanah, H.; Abnous, K.; Khedri, M.; Ramezani, M. SELEX Methods on the Road to Protein Targeting with Nucleic Acid Aptamers. *Biochimie* **2018**, *154*, 132–155. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.09.001>.
- (163) Lupold, S. E.; Hicke, B. J.; Lin, Y.; Coffey, D. S. Identification and Characterization of Nuclease-Stabilized RNA Molecules That Bind Human Prostate Cancer Cells via the Prostate-Specific Membrane Antigen. *Cancer Res.* **2002**, *62* (14), 4029–4033.
- (164) Rockey, W. M.; Hernandez, F. J.; Huang, S.-Y.; Cao, S.; Howell, C. A.; Thomas, G. S.; Liu, X. Y.; Lapteva, N.; Spencer, D. M.; McNamara, J. O.; Zou, X.; Chen, S.-J.; Giangrande, P. H. Rational Truncation of an RNA Aptamer to Prostate-Specific Membrane Antigen Using Computational Structural Modeling. *Nucleic Acid Ther.* **2011**, *21* (5), 299–314. <https://doi.org/10.1089/nat.2011.0313>.
- (165) Krissinel, E.; Henrick, K. Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. *J. Mol. Biol.* **2007**, *372*, 774–797. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.022>.
- (166) Cardinale, J.; Roscher, M.; Schäfer, M.; Geerlings, M.; Benešová, M.; Bauder-Wüst, U.; Remde, Y.; Eder, M.; Nováková, Z.; Motlová, L.; Barinka, C.; Giesel, F. L.; Kopka, K. Development of PSMA-1007-Related Series of 18F-Labeled Glu-Ureido-Type PSMA Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (19), 10897–10907. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01479>.

- (167) Benešová, M.; Schäfer, M.; Bauder-Wüst, U.; Afshar-Oromieh, A.; Kratochwil, C.; Mier, W.; Haberkorn, U.; Kopka, K.; Eder, M. Preclinical Evaluation of a Tailor-Made DOTA-Conjugated PSMA Inhibitor with Optimized Linker Moiety for Imaging and Endoradiotherapy of Prostate Cancer. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **2015**, *56* (6), 914–920. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.147413>.
- (168) Hofman, M. S.; Violet, J.; Hicks, R. J.; Ferdinandus, J.; Thang, S. P.; Akhurst, T.; Iravani, A.; Kong, G.; Ravi Kumar, A.; Murphy, D. G.; Eu, P.; Jackson, P.; Scalzo, M.; Williams, S. G.; Sandhu, S. [177Lu]-PSMA-617 Radionuclide Treatment in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer (LuPSMA Trial): A Single-Centre, Single-Arm, Phase 2 Study. *Lancet Oncol.* **2018**, *19* (6), 825–833. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30198-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30198-0).
- (169) Kratochwil, C.; Bruchertseifer, F.; Giesel, F. L.; Weis, M.; Verburg, F. A.; Mottaghy, F.; Kopka, K.; Apostolidis, C.; Haberkorn, U.; Morgenstern, A. 225Ac-PSMA-617 for PSMA-Targeted α -Radiation Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **2016**, *57* (12), 1941–1944. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.178673>.

8 Seznam publikací autorky

- (1) Bumba, L.; Masin, J.; Macek, P.; Wald, T.; Motlova, L.; Bibova, I.; Klimova, N.; Bednarova, L.; Veverka, V.; Kachala, M.; Svergun, D. I.; Barinka, C.; Sebo, P. Calcium-Driven Folding of RTX Domain β -Rolls Ratchets Translocation of RTX Proteins through Type I Secretion Ducts. *Mol Cell* **2016**, *62* (1), 47–62. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.018>. **IF: 14.714**
- (2) Nakajima, R.; Nováková, Z.; Tueckmantel, W.; Motlová, L.; Bařinka, C.; Kozikowski, A. P. 2-Aminoadipic Acid-C(O)-Glutamate Based Prostate-Specific Membrane Antigen Ligands for Potential Use as Theranostics. *ACS Med Chem Lett* **2018**, *9* (11), 1099–1104. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.8b00318>. **IF: 3.737**
- (3) Barinka, C.; Novakova, Z.; Hin, N.; Bím, D.; Ferraris, D. V.; Duvall, B.; Kabarriti, G.; Tsukamoto, R.; Budesinsky, M.; Motlova, L.; Rojas, C.; Slusher, B. S.; Rokob, T. A.; Rulišek, L.; Tsukamoto, T. Structural and Computational Basis for Potent Inhibition of Glutamate Carboxypeptidase II by Carbamate-Based Inhibitors. *Bioorg Med Chem* **2019**, *27* (2), 255–264. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.11.022>. **IF: 3.073**
- (4) Kim, K.; Kwon, H.; Barinka, C.; Motlova, L.; Nam, S.; Choi, D.; Ha, H.; Nam, H.; Son, S.-H.; Minn, I.; Pomper, M. G.; Yang, X.; Kutil, Z.; Byun, Y. Novel β - and γ -Amino Acid-Derived Inhibitors of Prostate-Specific Membrane Antigen. *J Med Chem* **2020**, *63* (6), 3261–3273. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b02022>. **IF: 7.446**
- (5) Shen, S.; Svoboda, M.; Zhang, G.; Cavasin, M. A.; Motlova, L.; McKinsey, T. A.; Eubanks, J. H.; Bařinka, C.; Kozikowski, A. P. Structural and in Vivo Characterization of Tubastatin A, a Widely Used Histone Deacetylase 6 Inhibitor. *ACS Med Chem Lett* **2020**, *11* (5), 706–712. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00560>. **IF: 4.345**
- (6) Ptacek, J.; Zhang, D.; Qiu, L.; Kruspe, S.; Motlova, L.; Kolenko, P.; Novakova, Z.; Shubham, S.; Havlinova, B.; Baranova, P.; Chen, S.-J.; Zou, X.; Giangrande, P.; Barinka, C. Structural Basis of Prostate-Specific Membrane Antigen Recognition by the A9g RNA Aptamer. *Nucleic Acids Res* **2020**, *48* (19), 11130–11145. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa494>. **IF: 16.971**
- (7) Motlova, L.; Klimova, N.; Fiser, R.; Sebo, P.; Bumba, L. Continuous Assembly of β -Roll Structures Is Implicated in the Type I-Dependent Secretion of Large Repeat-in-Toxins (RTX) Proteins. *J Mol Biol* **2020**, *432* (20), 5696–5710. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.08.020>. **IF: 5.469**
- (8) Cardinale, J.; Roscher, M.; Schäfer, M.; Geerlings, M.; Benešová, M.; Bauder-Wüst, U.; Remde, Y.; Eder, M.; Nováková, Z.; Motlová, L.; Barinka, C.; Giesel, F. L.; Kopka, K. Development of PSMA-1007-Related Series of ^{18}F -Labeled Glu-Ureido-Type PSMA Inhibitors. *J Med Chem* **2020**, *63* (19), 10897–10907. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01479>. **IF: 7.446**

9 Souhrn článků, příspěví autorky

9.1 Souhrn „Calcium-Driven Folding of RTX Domain β -Rolls Ratchets Translocation of RTX Proteins through Type I Secretion Ducts.“²⁷

Příspěvek autorky: 10 %

Produkce: RTX CyaA blok 5

Krystalizace: RTX CyaA blok 5

Rafinace modelů: RTX CyaA blok 5

Validace a nahrání modelů do RCSB PDB databáze: RTX CyaA blok 5CVW a 5CXL

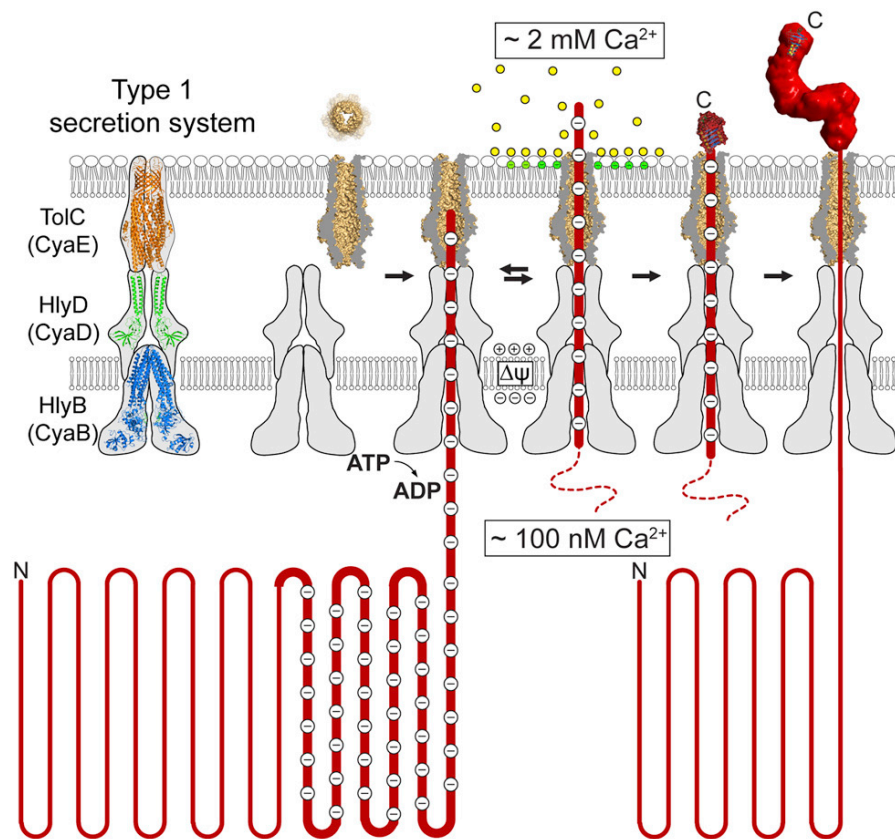
Analýza a porovnání struktury RTX CyaA blok 5 s ostatními RTX proteiny s vyřešenou strukturou

Souhrn publikace:

Tato publikace pojednává o některých aspektech mechanismu jednokrokové sekrece adenylátcyklázového toxinu z bakterie *Bordetella pertussis* skrze bakteriální sekreční systém typu I (TISS) a jakou roli v této sekreci hraje RTX doména a její balení do nativní konformace za přítomnosti vápenatých kationtů.

Za použití strukturních metod (proteinová krystalografie, SAXS, NMR, měření CD spekter) a zkoumání sekrece mutant v RTX oblasti CyaA z bakterie *Bordetella pertussis* bylo zjištěno, že tzv. „capping structure“, která se objevuje i u ostatních RTX proteinů uložených v RCSB PDB databázi, spouští balení CyaA do nativní konformace při sekreci CyaA z bakteriální buňky, kde je nízká koncentrace vápenatých kationtů do vnějšího prostředí, kde je jejich koncentrace řádově vyšší. Balení CyaA probíhá kooperativně od tzv. „capping structure“ na C-konci a pravděpodobně napomáhá samotné sekreci proteinu ven z bakteriální buňky, tím, že zamezí prokluzování nesbaleného protein zpět do bakteriální buňky. Také záporný náboj RTX domény pravděpodobně napomáhá sekreci CyaA využitím elektroforetických sil zapříčiněných povrchovým nábojem bakteriální membrány. Analýzou sekrece CyaA s delecí části RTX domény a sekvence příbuzných RTX proteinů bylo také zjištěno, že čím větší je RTX protein je, tím větší potřebuje RTX doménu pro svojí sekreci.

Na základě získaných výsledků bylo upraveno schéma sekrece RTX¹²⁷ proteinů pomocí TISS (**Obr. 27**). Práce byla do dnešního dne hojně citována (93 citačních ohlasů).



Obr. 27: Grafický abstrakt publikace Bumba *et al.* 2016²⁷ znázorňující upřesněný mechanismus sekrece CyaA.

9.2 Souhrn „2-Aminoadipic Acid-C(O)-Glutamate Based Prostate-Specific Membrane Antigen Ligands for Potential Use as Theranostics.“¹²⁸

Příspěvek autorky: 15 %

Krystalizace: 6HKJ, 6HKZ, 6H7Z, 6H7Y

Naměření datasetů na difraktometru/synchrotronu, zpracování dat: 6HKJ, 6HKZ, 6H7Z, 6H7Y

Rafinace modelů: 6HKJ, 6H7Z, 6H7Y

Validace a nahrání modelů do RCSB PDB databáze: 6HKJ, 6HKZ, 6H7Z, 6H7Y, 5OF0

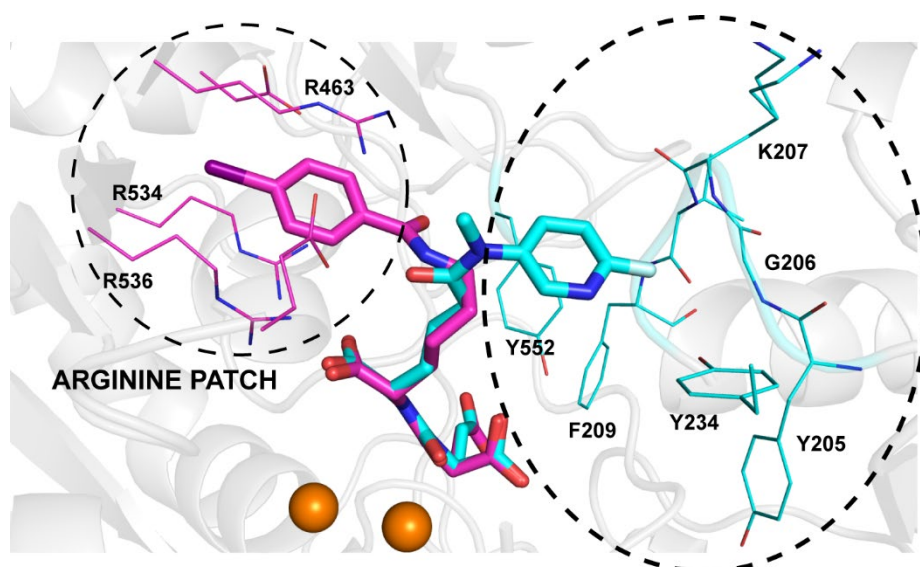
Příprava části obrázků do publikace

Souhrn publikace:

Jako velká povrchová molekula je glutamát karboxypeptidáza II (GCPII, PSMA – pro prostatu specifický membránový antigen, FOLH1 – folát hydroláza) ideálním cílem pro diagnostiku a léčbu rakoviny prostaty. Většina buněk rakoviny prostaty produkuje mnohem větší množství GCPII v porovnání se zdravými prostatickými buňkami. Množství GCPII na rakovinných buňkách přímo koreluje s prognózou onemocnění^{129,130}.

Tato publikace pojednává o optimalizaci inhibitorů/značek proteinu GCPII vložení kyseliny 2-aminoadipové jako nově použitého stavebního bloku do skupiny nízkomolekulárních inhibitorů odvozených od močoviny a značených radionuklidy pro diagnostiku rakoviny prostaty pomocí metody PET (Pozitronová emisní tomografie). Modulací inhibitorů odvozených od močoviny si studie slibuje lepší vlastnosti pro diagnostickou a léčebnou funkci. Především možnost snížení dávky díky zlepšení rozlišení značením radioaktivním fluorem¹³¹.

Byla vytvořena série inhibitorů s různě dlouhými linkery mezi aromatickou a močovinou složkou inhibitoru a různými aromatickými N-substituenty, které byly charakterizovány poloviční maximální inhibiční koncentrací IC_{50} a u části byla provedena i krystalografická analýza. V případě použití 2-aminoadipové kyseliny jako linkeru a pyridinového kruhu jako N-substituentu s navázaným atomem fluoru, který může být použit na radioaktivní značení, dosahovala IC_{50} nejnižších hodnot v porovnání se všemi testovanými inhibitory. **Obr. 28** porovnává rozdíly ve vazbě do aktivního místa mezi „kanonickým“ inhibitorem DCIBzL ($IC_{50} = 0,021 \pm 0,004$ nM) a nově vyvinutým ligandem 13b ($IC_{50} = 0,075 \pm 0,005$ nM).



Obr. 28: GCPII komplexy s ligandem DCIBzL – PDB 3D7H (fialová) představujícím kanonickou sekvenci u nízkomolekulárních inhibitorů odvozených od močoviny a ligandem 13b – PDB 6H7Z (tyrkysová), který z testovaných inhibitorů dosáhl nejlepších. Grafický abstrakt převzat a upraven Nakajima *et al.* 2018¹²⁸.

9.3 Souhrn článku „Structural and Computational Basis for Potent Inhibition of Glutamate Carboxypeptidase II by Carbamate-Based Inhibitors.“¹³²

Příspěvek autorky: 10 %

Měření datasetů na difraktometru/synchrotronu, zpracování dat: 6ETY, 6EZ9, 6F5L, 6FE5

Rafinace modelů: 6F5L

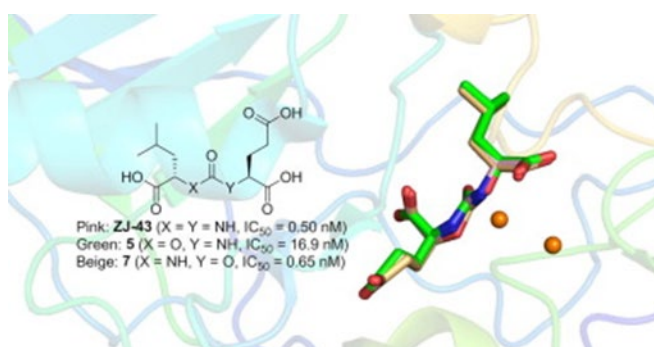
Validace a nahrání modelů do RCSB PDB databáze: 6ETY, 6EZ9, 6F5L, 6FE5

Příprava části obrázků do publikace

Souhrn publikace:

Protein GCPII je pro svou enzymatickou aktivitu v různých orgánech zkoumán společně s jeho inhibitory pro využití v léčbě širokého spektra nemocí od neurologických poruch^{133,134}, přes rakovinu prostaty^{135,136}, až po Crohnovu chorobu^{137,138}. Bylo vytvořeno mnoho GCPII inhibitorů na různých bázích, které by mohly být potenciálními terapeutiky. Tato publikace se zaměřuje na nízkomolekulární inhibitory odvozené od inhibitoru ZJ-43 (inhibitor odvozený od močoviny) (**Obr. 29**) a jaký vliv na jejich účinnost má výměna jednoho nebo druhého atomu dusíku v močovinovém modulu za molekulu kyslíku a vytvoření karbamátu. Podobné molekuly už byly zkoumány kvůli zajištění lepší distribuce v tkáni za účelem radioterapie¹³⁹, ale ne systematicky a za zjištěním mechanismu větší účinnosti inhibitoru, pokud je vyměněn dusík blíže aktivnímu místu proteinu, tedy pokud v S1' místě (glutamát rozpoznávací místo) sedí místo glutamátu α -ketoglutarát.

Výsledky potvrdily pomocí poloviční maximální inhibiční koncentrací IC_{50} , že karbamát odvozený od ZJ-43 se stejnou stereochemickou orientací s α -ketoglutarátem (inhibitor 7) je potentnější než ten, co obsahuje glutamát (inhibitor 5), ačkoli mají srovnatelný počet interakcí s GCPII interní kavitou (**Obr. 29**). Možné vysvětlení tohoto jevu nabízí výpočet deformační energie a solvatační/desolvatační energie. Jejich součet vyšel shodně pro ZJ-43 a inhibitor 7: 4,2 kcal/mol, zatímco pro inhibitor 5: 6,5 kcal/mol.



Obr. 29: Porovnání účinnosti močovinového inhibitoru GCPII ZJ-43 (růžová) s od něj odvozenými karbamáty inhibitoru 5 (zelená) s glutamátem na C-konci a inhibitoru 7 (běžová) s α -ketoglutarátem na C-konci a jejich strukturální porovnání v GCPII interní kavitě. Oranžově jsou označeny Zn kationy. Grafický abstrakt převzat z Bařínka *et al.* 2019¹³².

9.4 Souhrn článku „Novel β - and γ -Amino Acid-Derived Inhibitors of Prostate-Specific Membrane Antigen.“¹⁴⁰

Příspěvek autorky: 5 %

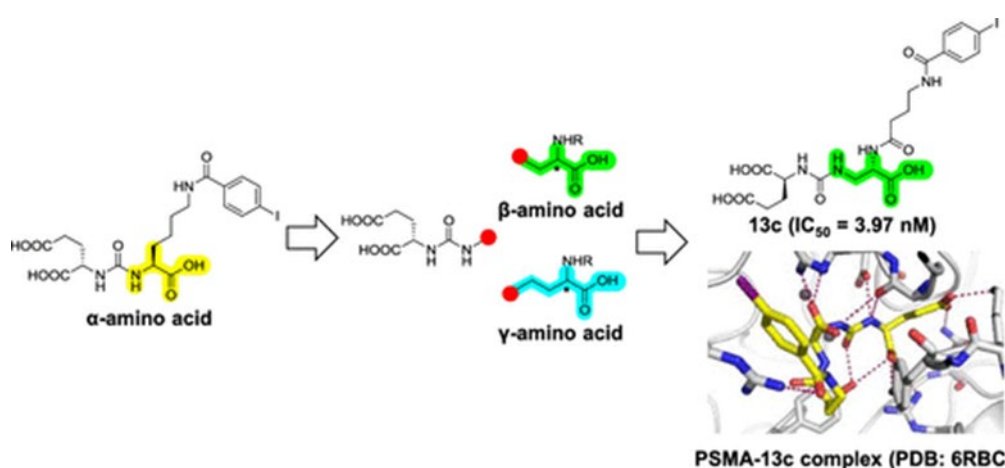
Krystalizace: 6RBC, 6S1X

Měření datasetů na synchrotronu, zpracování dat bez rafinace: 6RBC, 6S1X

Souhrn publikace:

Rakovina prostaty je jednou z nejčastěji diagnostikovaných rakovin, která většinou nevykazuje příznaky, dokud není v pokročilém stádiu¹⁴¹. V USA je na druhém místě v počtu úmrtí mužů na rakovinu za rok 2020¹⁴². Pro prostatu specifický membránový antigen (PSMA) je atraktivní biomarker pro diagnostiku a predikci průběhu rakoviny prostaty, protože jeho exprese pozitivně koreluje s mírou agresivity tumoru a vzniku metastází^{129,130,143}. Nejvíce slibné PSMA-cílené molekuly, které jsou v klinické fázi výzkumu jsou odvozené od močovinného inhibitoru DCIBzL s vazebným motivem jodobenzamido-Lys-urea-Glu (YC2.pdb)¹⁴⁴. Tato publikace se zabývala vztahem struktury a aktivity v případě vytvoření inhibitorů, které nahrazovaly Lys (P1 místo) β - a γ -aminokyselinové analogy a jejich enantiomery.

Bylo zjištěno, že R-enantiomery β -aminokyselinových analogů jsou účinnější než S-enantiomery. V případě γ -aminokyselinových analogů tomu bylo právě naopak. (2~{S})-2-[[[(2~{R})-2-[4-[(4-jodofenyl)karbonylamino]butanoylamino]-3-oxidanyl-3-oxidanylidene-propyl]karbamoylamino]glutarát (inhibitor 13c) měl nejlepší inhibiční vlastnosti, přesto byl 18 x méně účinný než DCIBzL, od něhož byl odvozený (**Obr. 30**). Přesto jeho inhibiční vlastnosti dosahovali podobné úrovně, jako inhibiční vlastnosti DCFPyL¹⁴⁵, který ve fázi klinického testování. Inhibitor 13c by po radioznačení mohl být použit jako diagnostický marker rakoviny prostaty.



Obr. 30: Schéma odvození β - a γ -aminokyselinové analogů od DCIBzL¹⁴⁴ až k nejúčinnějšímu inhibitoru 13c z této studie a jeho vazba v aktivním místě PSMA. Grafický abstrakt převzat z Kim *et al.* 2020¹⁴⁰.

9.5 Souhrn článku „Structural and in Vivo Characterization of Tubastatin A, a Widely Used Histone Deacetylase 6 Inhibitor.“¹⁴⁶

Příspěvek autorky: 10 %

Krystalizace a její optimalizace: 6THV

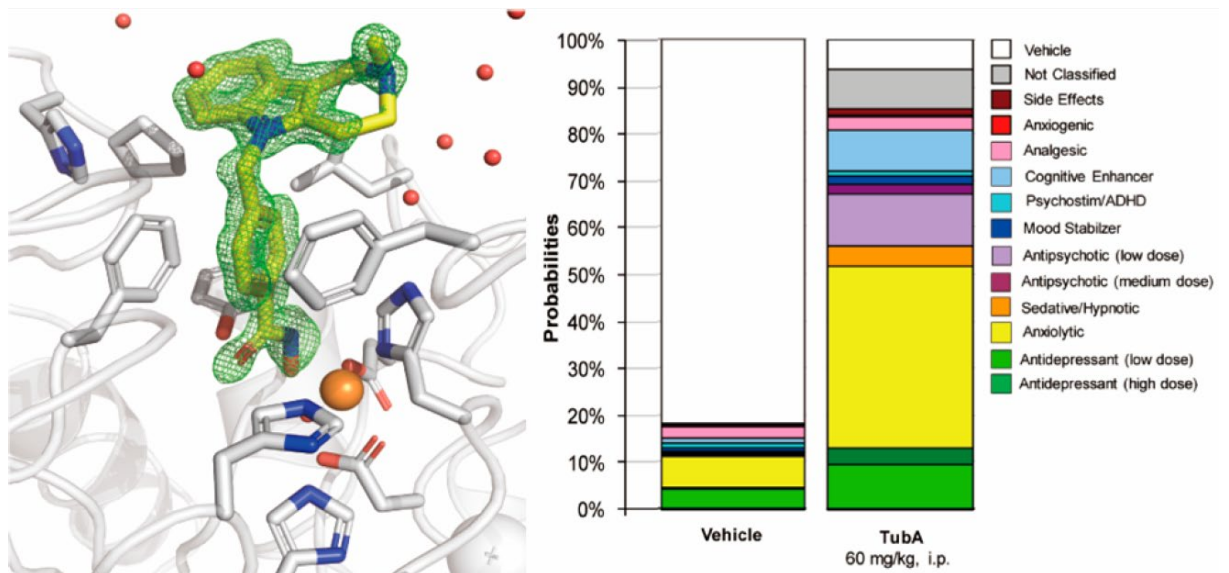
Zpracování dat bez rafinace: 6THV

Souhrn publikace:

Histon deacetylázy jsou rodinou enzymů, která deacetyluje postranní řetězce lysinu v proteinech. HDAC6, který patří do třídy histon deacetyláz Iib¹⁴⁷, reguluje hlavně acetylaci cytozolických proteinů např. α -tubulinu¹⁴⁸, HSP-90 (protein teplotního šoku - 90 z angl. „heat shock protein - 90“), peroxiredoxinu, kortaktinu a HSF-1 (faktor teplotního šoku 90 z angl. „heat shock factor 1“) ¹⁴⁹. Bylo prokázáno, že HDAC6 funguje jako hlavní deacetyláza tubulinu *in vitro* i *in vivo*^{149,150}. Farmakologické studie provedené v posledním desetiletí prokázaly, že inhibice HDAC6 zlepšuje symptomy neurodegenerativních onemocnění způsobených nefunkčním axonovým transportem nebo nefunkčním přenosem mozkového neurotrofního faktoru (BDNF – z angl. Brain Derived Neurotrphic Factor) např. Alzheimerovy chorobu¹⁵¹, Charcot–Marie–Tooth choroby¹⁵², amyotrofické laterální sklerózy¹⁵³ a Rettova syndromu¹⁵⁴. HDAC6 je tedy ve středu zájmu výzkumu velké škály neurodegenerativních onemocnění. Tubastatin A (TubA, 4-[(2-methyl-3,4-dihydro-1~{H}-pyrido[4,3-b]indol-5-yl)methyl]-~{N}-oxidanyl-benzamide) je účinným inhibitorem HDAC6¹⁵⁵.

Tato studie se zabývala strukturní analýzou interakce TubA s HDAC6-CD2 (doména 2) z organismu *Danio rerio*, určováním schopnosti HDAC6 zvyšovat koncentraci acetylovaného α -tubulinu a korelaci těchto výsledků s farmakokinetickými/farmakodynamickými profily v plazmě a mozku a posouzení terapeutického potenciálu TubA v léčbě psychiatrických onemocněních.

Struktura komplexu *dr*HDAC6-CD2 a TubA byla vyřešena v atomárním rozlišení 1.1 Å (Obr. 31 vlevo) a poodhalila molekulární princip interakce TubA a HDAC6. Dále byl v této publikaci potvrzen terapeutický potenciál TubA pro psychiatrická onemocnění (Obr. 31 vpravo).



Obr. 31: Vlevo: krystalová struktura komplexu *dr*HDAC6-CD2 s TubA detailní pohled na AK zbytky vymezující aktivní místo a substrátový tunel. Fo-Fc mapa elektronových hustot je označena zelenou sítí ($\sigma = 4,0$). TubA (žlutá) a vybrané AK *dr*HDAC6-CD2 (bílo-šedá) mají označeny červeně kyslík a modře dusík. Aktivní místo navíc obsahuje zinečnatý kation (oranžová koule) a molekuly vody (červené koule). Vpravo: Efekt TubA (60 mg/ml, administrovaný intraperitoneálně) na chování myšního modelu a jeho terapeutický potenciál v psychiatrických onemocněních. Grafický abstrakt převzat z Shen *et al.* 2020¹⁴⁶.

9.6 Souhrn článku „Structural Basis of Prostate-Specific Membrane Antigen Recognition by the A9g RNA Aptamer.“¹⁵⁶

Příspěvek autorky: 10 %

Krystalizace: 6RTI

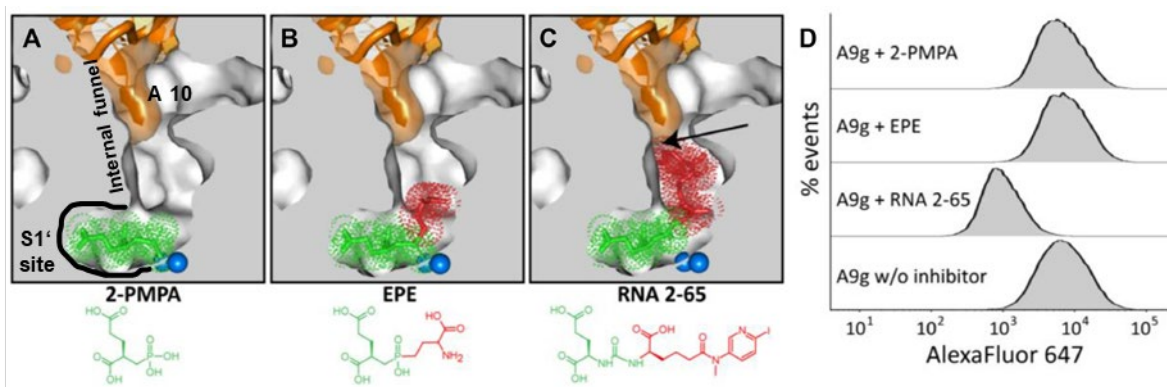
Měření datasetu na synchrotronu, zpracování dat bez rafinace: 6RTI

Příprava části obrázků do publikace

Souhrn publikace:

Pro prostatu specifický membránový antigen (PSMA) je velmi dobře prozkoumaný marker rakoviny prostaty a neovaskularity většiny solidních (pevných) nádorů. Zatím jediný schválený přípravek americkou „Food and drug administration“ pro detekci PSMA je ProstaScint (¹¹¹In radioznačená protilátka 7E11-C5)^{157,158}. Mimo protilátky jsou pro vývoj diagnostického markeru, popř. terapeutika, zkoumané tzv. „engineered protein scaffolds“¹⁵⁹, nanočástice¹⁶⁰ či malé molekuly¹⁶¹. Tato publikace se zabývala využitím aptameru, syntetického oligonukleotidu, který získává vysokou afinitu a specifitu díky unikátnímu 3D konformaci pro přesnější cílení na makromolekuly. Aptamery mohou být vytvořeny pomocí *in vitro* selekčního procesu SELEX („systematic evolution of ligands by exponential enrichment“)¹⁶². Lupold *et al.* v roce 2002¹⁶³ použil extracelulární část PSMA pro selekci aptameru A9, který bude schopen inhibovat PSMA enzymatickou aktivitu a zároveň se na PSMA bude vázat v nanomolárních koncentracích. Později byl aptamer A9 ještě zkrácen na minimální stále funkční molekulu A9g obsahující 43 nukleotidů¹⁶⁴.

V této studii byla detailně popsána získaná krystalová struktura komplexu aptameru A9g, 2-PMPA (kyselina 2-(fosfonomethyl)pentandiová pro stabilizaci PSMA) a lidského PSMA. Interakce PSMA a A9g zahrnuje 3096 Å² „solvent accessible surface area“ z PSMA a A9g dohromady a podílí se na ní 25 z 43 nukleotidů A9g (výsledky z programu Pisa¹⁶⁵). Bylo ukázáno, že A9g se na rozdíl od malých inhibitorů neváže do S1' místa ale pouze blokuje vstup do aktivního místa Adenosinem A 10 (**Obr. 32A**) a tím zastavuje peptidázovou aktivitu PSMA. Inhibitory s větší P1' oblastí mohou kompetitivně zabránit vazbě A9g na PSMA, menší inhibitory, popř. přirozené substráty (NAAG - N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát), mohou být zablokovány v aktivním místě PSMA (**Obr. 32**). PSMA Serin 317 se ukázal jako nezbytný pro vysoko afinitní A9g vazbu a jeho substituce za histidin úplně zabránila interakci PSMA a Ag9. Na rozdíl od malých molekul cílících na PSMA, které často interagují i s lidských paralogem PSMA zvaným GCPIII (Glutamát karboxypeptidáza III) se zdá A9g vysoce specifickým bez podobných křížových interakcí. Získané výsledky mohou být využity pro vývoj dalších generací nejen aptamerových vazebných partnerů pro PSMA.



Obr. 32: A-C: Superpozice uhlíkových atomů komplexu PSMA/A9g a komplexů PSMA/2-PMPA (2JBJ.pdb; panel A) za PSMA/2-EPE (3BI0.pdb; panel B) a PSMA/RNA 2-65(6H7Z.pdb; panel C). Řez PSMA je zobrazen šedě, jeho vnitřní inhibitor-vazebná kapsa bíle, A9g v polo-transparentním zobrazení povrchu oranžově a zinečnaté kationy modře. Části inhibitorů mají označenou P1 oblast červeně a oblast P1' se zinek-vazebným místem zeleně. Sterická kolize (z angl. „clash“) mezi Adenosinem A 10 z A9g aptameru a P1 částí RNA 2-65 je zvýrazněna šipkou (C). D: Analýza kompetice A9g a PSMA specifických inhibitorů pomocí průtokové cytometrie. PC3-PIP buňky (PSMA exprimující) byly pre-inkubovány s 1 μ M inhibitoru. 100 nm Alexa Fluor647 značený A9g byl přidán k buněčné suspenzi a analyzován průtokovou cytometrií (LSRFortessa flow cytometer). Převzato a upraveno Ptacek et al. 2020 Obrázek 8 (Figure 8)¹⁵⁶.

9.7 Souhrn článku „Continuous Assembly of β -Roll Structures Is Implicated in the Type I-Dependent Secretion of Large Repeat-in-Toxins (RTX) Proteins.“⁴⁰

Příspěvek autorky: 45 %

Krystalizace a její optimalizace: RTX CyaA blok 4 a 5

Měření datasetů na synchrotronu, zpracování dat bez rafinace: RTX CyaA blok 4 a 5

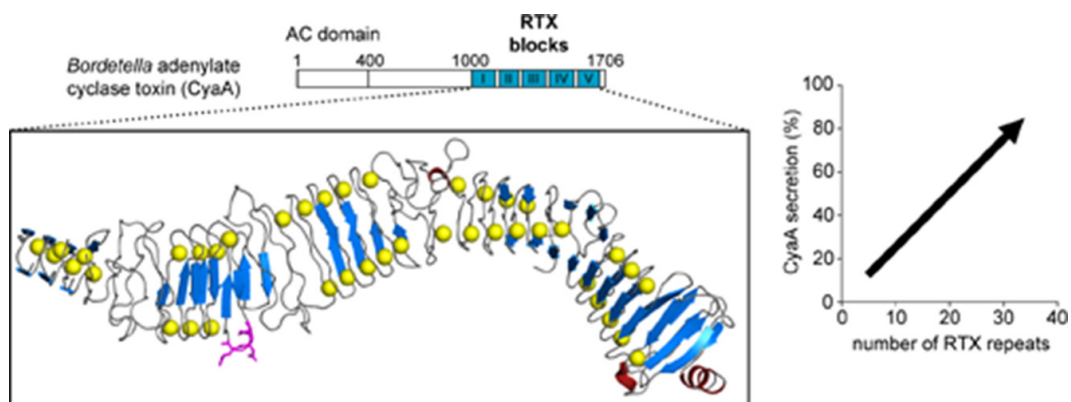
Rafinace modelu: RTX CyaA blok 4 a 5

Validace a nahrání modelů do RCSB PDB databáze: 6SUS

Analýza a porovnání struktury 6SUS s ostatními RTX proteiny s vyřešenou strukturou

Souhrn publikace:

Tento článek, jako prvoautorská publikace, je diskutován v dizertační práci. Práce má po roce od publikování 4 citační ohlasy.



Obr. 33: Grafický abstrakt z Motlová et al.⁴⁰

9.8 Souhrn článku „Development of PSMA-1007-Related Series of 18F-Labeled Glu-Ureido-Type PSMA Inhibitors.“¹⁶⁶

Příspěvek autorky: 5 %

Krystalizace: 5O5R, 5O5U

Měření datasetů na synchrotronu, zpracování dat bez rafinace: 5O5R, 5O5U

Rafinace modelu: 5O5R

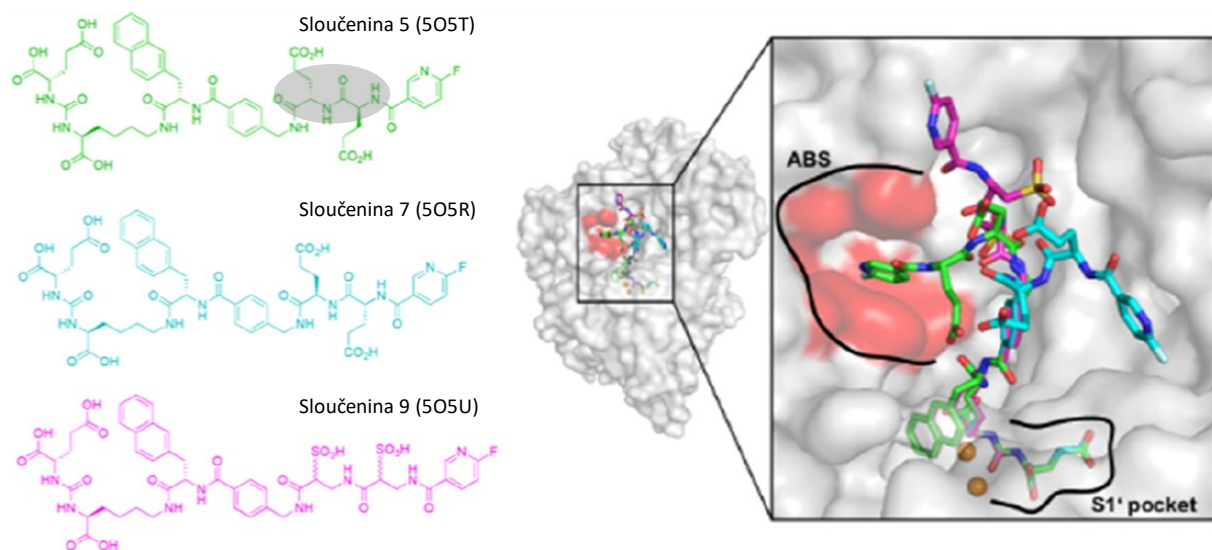
Validace a nahrání modelů do RCSB PDB databáze: 5O5T, 5O5R, 5O5U

Souhrn publikace:

V posledních letech se stal pro prostatu specifický membránový antigen (PSMA) důležitým diagnostickým i terapeutickým cílem výzkumu rakoviny prostaty. Tato studie se zaměřila na PSMA ligandy odvozené od PSMA-617 (od urey odvozený inhibitor (Glu-urea-Lys) s chelátorem DOTA - 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraacetát)¹⁶⁷, který díky DOTA nabízí možnost vazby široké škály radionuklidů pro diagnostiku i léčbu rakoviny prostaty^{168,169}. Modifikace zahrnovaly výměnu DOTA za kyselinu fluoronikotinovou, která umožňuje snadné vložení ¹⁸fluoru, a změny hydrofobicity v linkeru mezi od urey odvozeným vazebným motivem a fluoronikotinovou kyselinou, které jsou významné pro afinitu k PSMA a příjem cílovými orgány¹⁶⁷.

Bylo vytvořeno 12 různých sloučenin. Všechny prošly hodnocením afinity k PSMA, specificity vazby na buňky a míry internalizace PSMA obsahujícími buňkami LNCaP (metastatické buňky rakoviny prostaty odvozené z levé supraventrikulární lymfatické uzliny). Sloučeniny 3 a 5 byly dále testovány pozitronovou emisní tomografií na míru jejich distribuce v myších orgánech. Sloučeniny 5, 7 a 9 byly vykrytalizovány a jejich struktura byla v této publikaci popsána. Sloučenina 5 obsahuje jako linker B (oblast za fluoronikotinovou kyselinou) L-Glu-L-Glu. Sloučenina 7 se od ní liší pouze stereochemicky, protože linker B je D-Glu-D-Glu. Sloučenina 9 obsahuje dva sulfo-Ala. Vazba sloučeniny 5 na PSMA byla nejlépe definovaná mapou elektronových denzity a díky délce a geometrii linkeru B okupovala i arene-vazebné místo (ABS) (**Obr. 34**).

Po všech *in vitro* a *in vivo* hodnoceních vyrobených sloučenin byla sloučenina 5 nakonec označena jako nejlepší kandidát klinickou aplikací PET zobrazení rakoviny prostaty.



Obr. 34: Levý panel: Struktura sloučenin 5 (zelená), 7 (tyrkysová) a 9 (fialová) se od sebe liší pouze linkerem B (šedý ovál): L-Glu-L-Glu (5), D-Glu-D-Glu (7), sulfo-Ala-sulfo-Ala (9). Pravý panel: Porovnání vazby sloučenin 5, 7 a 9 na PSMA. Fluronitrovinová část sloučeniny 5 je pevně ukotvená v arene-vazebném místě (ABS), což je umožněno geometrií a délkou linkeru B, zatímco fluronitrovinová část sloučenin 7 a 9 je volněji navázaná na povrchu PSMA. Grafický abstrakt převzat a upraven z Cardinale *et al.* 2020¹⁶⁶.

10 Přílohy

10.1 Sekvence proteinových produktů

Predikované RTX repetice jsou zvýrazněny červeně a zeleně. Červená značí repetice shodující se s ideální RTX repeticí v nejméně 4 AK. Zelená značí repetice shodující se s ideální RTX repeticí v méně než 4 AK.

ApxI (722-982) = RTX ApxI – úsek ApxI 261 AK, celá RTX doména.

```
722 - SNRKDKFF GSRFTDIFHG AKGDDEIYGN DGHDIYGGDD GNDVIHGGDG
NDHLVGGNGN DRLIGGKGNN FLNGGDGDDE LQVFEGQYNV LLGGAGNDIL
YGS DGTNLF D GGVGNDKIYG GLGKDIYRYS KEYGRHIIIE KGGDDDTLLL
SDLSFKDVGF IRIGD DLLVN KRIGG TLYYH EDYNGN ALTI KDWFKEGKEG
QNNKIEKIVD KDGAYVLSQY LTEL TAPGRG INYFN GLEEK LYYGEGYNAL
PQLRKDIEQI ISS - 982
```

CyaA (1528-1681) = CyaA blok 5 – úsek CyaA 154 AK, část RTX domény.

```
1529 - GS ARDDVLIGDA GANVLNGLAG NDVLSGGAGD DVLLGDEGSD
LLSGDAGNDD LFGGQGDDTY LFGVGYGHDT IYESGGGHDT IRINAGADQL
WFARQGNDLE IRILGTDDAL TVHDWYRDAD HRVEIIHAAN QAVDQAGIEK
LVEAMAQYPD P - 1681
```

CyaA (1371-1681) = CyaA blok 4-5 – úsek CyaA 311 AK, část RTX domény.

```
1371 - GILADLGAG RVDKLG EAGS SAYDTVSGIE NVVGTE LADR ITGDAQANVL
RGAGGADVLA GEGDDVLLG GDGDDQLSGD AGRDRLYGEA GDDWFFQDAA
NAGNLLDGGD GRDTVDFSGP GRGLDAGAKG VFLSLGKGFA SLMDEPETS N
VLRNIENAVGS ARDDVLIGDA GANVLNGLAG NDVLSGGAGD DVLLGDEGSD
LLSGDAGNDD LFGGQGDDTY LFGVGYGHDT IYESGGGHDT IRINAGADQL
WFARQGNDLE IRILGTDDAL TVHDWYRDAD HRVEIIHAAN QAVDQAGIEK
LVEAMAQYPD P - 1681
```

HlyA (733-976) = RTX Hly A – úsek HlyA 244 AK, celá RTX doména.

```
733 - GSKFTDIF HGADGDDHIE GNDGNDRLYG DKGNDT LSGG NGDDQLYGGD
GNDKLIGGAG NNYLN GGDGD DELQVQGNSL AKNVLSGGKG NDKLYGSEGA
DLLDGGE GND LLKGGYGNDI YRYLSGYGHH IIDDDGGKDD KLSLADIDFR
```

DVAFRREGND LIMYKAEGNV LSIGHKNGIT FRNWFEEKESG DISNHQIEQI
FDKDGRVITP DSLKKALEYQ QSNNKASYVY GNDALAYGSQ DNLNPL - 976

LtxA (722-979) původní konstrukt = RTX LtxA – úsek LtxA 258 AK, celá RTX doména.

722 - GSTLRDKFY GSKFNDVFHG HDGDDLIYGY DGDDRLYGDN GNDEIHGGQG
NDKLYGGAGN DRLFGEYGNN YLDGGEEDDH LEGGNGSDIL RGGSGNDKLF
GNQGDDLLDG GEGDDQLAGG EGNDIYVYRK EYGHHTITEH SGDKDKLSLA
NINLKDVSEFEN RGNDDLKKT NNRTAVTFKG WFSKPNSSAG LDEYQRKLE
YAPEKDRARL KRQFELQRGK VDKSLNNKVE EIIGKDGRI TSQDIDNLF
KSGNKKTIS - 979

LtxA (733-919) krystalizovaný konstrukt = RTX LtxA – úsek LtxA 187 AK, celá RTX doména.

733 - KFNDVFHG HDGDDLIYGY DGDDRLYGDN GNDEIHGGQG NDKLYGGAGN
DRLFGEYGNN YLDGGEEDDH LEGGNGSDIL RGGSGNDKLF GNQGDDLLDG
GEGDDQLAGG EGNDIYVYRK EYGHHTITEH SGDKDKLSLA NINLKDVSEFEN
RGNDDLKKT NNRTAVTFKG WFSKPNSSAG LDEYQRKLE - 919

10.2 Publikace autora