

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Michaela Lichvárová

Studium interakce acyltransferasy RtxC s toxinem RtxA bakterie *Kingella kingae*

Investigation of the acyltransferase RtxC interaction with the *Kingella kingae* toxin
RtxA

Diplomová práce

Vedoucí práce: Ing. Adriana Osíčková, Ph.D.

Konzultant: Ing. Radim Osíčka, Ph.D.

Praha, 2024

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 dne 16. 5. 2024

Bc. Michaela Lichvárová

Poděkování

Ráda bych poděkovala mé školitelce Ing. Adrianě Osičkové, Ph.D. a mému konzultantovi Ing. Radimovi Osičkovi, Ph.D. za jejich vedení a podporu při zpracování předkládané práce. Také bych ráda poděkovala RNDr. Jiřímu Mašínovi, Ph.D., Mgr. Michaele Grobarčíkové, MSc. Kevinovi Navarrete a Lucii Nemčkové, kteří se podíleli na společném projektu, za jejich pomoc v laboratoři a odborné rady. Také bych ráda poděkovala vedoucímu laboratoře prof. Ing. Peterovi Šebovi, CSc. za možnost vypracování diplomové práce v Laboratoři molekulární biologie bakteriálních patogenů MBÚ, AV ČR, v. v. i. a celému kolektivu dané laboratoře za přátelské pracovní prostředí. Tento projekt bylo možné realizovat díky finanční podpoře z Projektu Národního institutu virologie a bakteriologie (Program EXCELES, ID: LX22NPO5103) - Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

Abstrakt

Bakterie *Kingella kingae* byla poprvé izolována v roce 1960 mikrobioložkou Elizabeth O. King a donedávna byla považována za vzácnou příčinu lidských onemocnění. Avšak, za posledních 30 let vzrůstá počet odborných prací ukazujících, že je tato bakterie významným pediatrickým patogenem, který napadá především děti ve věku od 6 měsíců do 3 let a způsobuje u nich hlavně septickou artritidu, osteomyelitidu, infekční endokarditidu a bakteriémií.

K. kingae vykazuje silný cytotoxický účinek vůči nejrůznějším typům hostitelských buněk, který je způsoben sekretovaným cytolyzinem RtxA patřícím do rodiny RTX (Repeats in ToXin) toxinů. RtxA se váže na glykosylované struktury hostitelské buňky, následně se vloží do její cytoplazmatické membrány a vytvoří v ní kation-selektivní póry, což vede k narušení iontové homeostázy a lýze napadené buňky. RtxA je produkován jako neaktivní protoxin proRtxA, jehož aktivace je zprostředkována acyltransferasou RtxC, která přenáší acylové řetězce na dva konzervované lysinové zbytky K558 a K689 v protoxinu. Jako donor acylu využívá acyl přenášející protein acyl-ACP.

V současnosti není jasné, jakým způsobem mezi sebou proteiny RtxC, acyl-ACP a proRtxA vzájemně interagují a které aminokyselinové zbytky jsou za tyto interakce zodpovědné. Cílem diplomové práce bylo na základě testování interakcí RtxC s acyl-ACP a proRtxA, pomocí bakteriálního dvouhybridního systému, identifikovat zbytky, které jsou za tyto interakce zodpovědné. Byly připraveny mutantní varianty ACP a proRtxA se substitucemi zbytků, které by na základě *in silico* predikcí mohly být zodpovědné za interakci těchto proteinů s RtxC. Následně byl testován vliv mutantních variant ACP a proRtxA na interakci s RtxC, přičemž jako zbytky důležité pro interakci s RtxC byly v proteinu ACP nalezeny zbytky D36, D39 a D57 a v proteinu proRtxA zbytek R697. Navíc bylo ukázáno, že se na interakci s RtxC také částečně podílí konzervovaný lysinový zbytek K558 protoxinu, zatímco konzervovaný lysinový zbytek K689 neměl na interakci s RtxC žádný vliv.

Klíčová slova: *Kingella kingae*, RtxA, acyltransferasa, posttranslační modifikace

Abstract

The bacterium *Kingella kingae* was first isolated in 1960 by microbiologist Elizabeth O. King and until recently, it was considered a rare cause of human disease. However, over the past 30 years, an increasing number of papers have shown that this bacterium is an important paediatric pathogen, mainly affecting children aged 6 months to 3 years, causing mainly septic arthritis, osteomyelitis, infective endocarditis, and bacteraemia.

K. kingae displays a strong cytotoxic effect against a variety of host cell types, which is caused by the secreted cytolysin RtxA, a member of the RTX (Repeats in ToXin) family. RtxA binds to glycosylated structures of the host cell, subsequently inserts into its cytoplasmic membrane, and forms cation-selective pores, leading to disruption of ion homeostasis and lysis of the attacked cell. RtxA is produced as an inactive protoxin proRtxA. Its activation is mediated by the acyltransferase RtxC, which transfers acyl chains to conserved lysine residues K558 and K689 in the protoxin. It uses the acyl carrier protein ACP as the acyl donor.

Currently, it is unclear how the RtxC, acyl-ACP, and proRtxA proteins interact with each other and which amino acid residues are responsible for these interactions. The aim of this thesis was to identify the residues responsible for these interactions by testing the interactions of RtxC with acyl-ACP and proRtxA, using a bacterial two-hybrid system. Mutant variants of ACP and proRtxA were prepared with substitutions of the residues that, based on *in silico* predictions, could be responsible for the interaction of these proteins with RtxC. Following that, the impact of the mutant variants of ACP and proRtxA on their interaction with RtxC was tested. The residues D36, D39 and D57 were found to be important for the interaction with RtxC in the ACP protein and the residue R697 in the proRtxA protein. In addition, the conserved lysine residue K558 of protoxin was also shown to be partially involved in the interaction with RtxC, whereas the conserved lysine residue K689 had no effect on the interaction with RtxC.

Keywords: *Kingella kingae*, RtxA, acyltransferase, posttranslational modification

Obsah

Seznam zkratk a symbolů	8
1 Úvod.....	10
1.1 <i>Kingella kingae</i>	10
1.1.1 Antibiotika	11
1.1.2 Mechanismus kolonizace hostitele	12
1.1.3 Vliv <i>K. kingae</i> na hostitelské buňky	13
1.1.4 Kultivace <i>K. kingae</i>	14
1.1.5 Epidemiologie <i>K. kingae</i>	14
1.2 RTX toxiny.....	15
1.2.1 Lokus <i>rtx</i>	16
1.2.2 Společné znaky RTX toxinů	17
1.2.3 Struktura acyltransferas	19
1.2.4 Sekrece RTX toxinů pomocí T1SS.....	20
1.2.5 Interakce RTX toxinů s hostitelskou buňkou	21
1.2.6 Tvorba membránových pórů.....	24
1.3 Dvouhybridní systémy	27
1.3.1 Bakteriální dvouhybridní systém	27
1.3.2 Princip provedení dvouhybridního systému	29
1.3.3 Plazmidy využívané ve dvouhybridním systému	30
2 Cíle diplomové práce	33
3 Přístroje a materiály	34
3.1 Přístroje	34
3.2 Materiály	34
3.2.1 Použité chemikálie	34
3.2.2 Použité roztoky	35
3.2.3 Plazmidy	36
3.2.4 Primery.....	38
3.2.5 Buňky.....	39
3.2.6 Použitá média.....	39
3.2.7 Použité sady	39
3.2.8 Enzymy	40
4 Metody.....	42
4.1 Příprava plazmidů s cílenou mutací v příslušném genu.....	42
4.1.1 Cílená PCR mutageneze	42

4.1.2	Elektroforéza v agarosovém gelu	45
4.1.3	Izolace PCR fragmentů z gelu	45
4.1.4	Štěpení PCR fragmentů	45
4.1.5	Štěpení a defosforylace plazmidů	46
4.1.6	Ligace štěpeného fragmentu se štěpeným plazmidem.....	46
4.1.7	Transformace buněk <i>E. coli</i> XL-1 Blue.....	47
4.1.8	Minipreparace plazmidové DNA.....	47
4.1.9	Ověření plazmidové DNA restričními endonukleasami	48
4.1.10	Sekvence připravených konstruktů	48
4.2	Vložení mutovaných DNA fragmentů do plazmidů dvouhybridního systému	48
4.3	Pěstování bakterií na MacConkey agaru.....	52
4.4	Měření enzymové aktivity β -galaktosidasy	53
5	Výsledky	54
5.1	Testování interakcí RtxC s ACP	56
5.2	Testování interakcí RtxC s mutantními variantami ACP.....	58
5.3	Testování interakcí RtxC s proRtxA	59
5.4	Testování interakcí mezi RtxC a RtxA ₅₂₉₋₇₁₈ s mutovanými zbytky K558 a K689	61
5.5	Testování interakcí RtxC se zkrácenými fragmenty proRtxA	62
5.6	Testování interakcí RtxC se zkrácenými fragmenty proRtxA s mutovanými zbytky K558 a K689	64
5.7	Testování interakcí mezi RtxC a RtxA ₆₂₄₋₇₁₈ s mutacemi v okolí zbytku K689	65
6	Diskuze	67
7	Závěr	71

Seznam zkratk a symbolů

ABC	ATP vázající kazeta (z angl. ATP-binding cassette)
AC	Adenylátcyklasa
ACP	Acyl přenášející protein (z angl. acyl carrier protein)
ATP	Adenosintrifosfát
BACTH	Bakteriální dvouhybridní systém (z angl. bacterial adenylate cyclase-based two-hybrid system)
BFB	Bromfenolová modř (z angl. bromophenol blue)
bp	Pár bází (z angl. base pair)
C14:0	Kyselina myristová
C14:0-OH	Kyselina hydroxymyristová
C16:0	Kyselina palmitová
C16:1	Kyselina palmitolejová
CAP	Katabolický aktivační protein (z angl. catabolite activator protein)
CHO buňky	Buňky vaječníků čínského křečka
CyaA	Adenylátcyklasový toxin bakterie <i>Bordetella pertussis</i>
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
HlyA	α -hemolyzin bakterie <i>Escherichia coli</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
LB médium	Luria Bertani médium
LtxA	Leukotoxin bakterie <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
MCS	Vícenásobné klonovací místo (z angl. multiple cloning site)
MDO médium	Růstové médium
MFP	Membránový fúzní protein (z angl. membrane fusion protein)
OD	Optická denzita
OMP	Protein vnější membrány (z angl. outer membrane protein)
PCR	Polymerasová řetězová reakce
PFT	Toxin tvořící pór (z angl. pore forming toxin)
PNGasa F	peptid-N-glykosidasa F

proRtxA	Protoxin RtxA
RPM	Otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
RTX	Opakující se sekvence v toxinu (z angl. repeats in toxin)
RTXA	Obecný RTX toxin tvořící póry v membráně hostitelské buňky
RtxA	RtxA toxin bakterie <i>Kingella kingae</i>
<i>rtx</i>	Lokus <i>rtx</i> nesoucí <i>rtx</i> geny
<i>rtxA</i>	Gen pro RtxA protoxin
<i>rtxB</i>	Gen pro RtxB protein
RTXC	Obecná acyltransferasa aktivující RTXA
<i>rtxC</i>	Gen pro acyltransferasu RtxC
<i>rtxD</i>	Gen pro RtxD protein
SDS-PAGE	Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného
T1SS	Sekreční systém typu 1
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl-ethylendiamin
<i>tolC</i>	Gen pro TolC protein
wt	Původní (divoký) typ (z angl. wild type)

1 Úvod

1.1 *Kingella kingae*

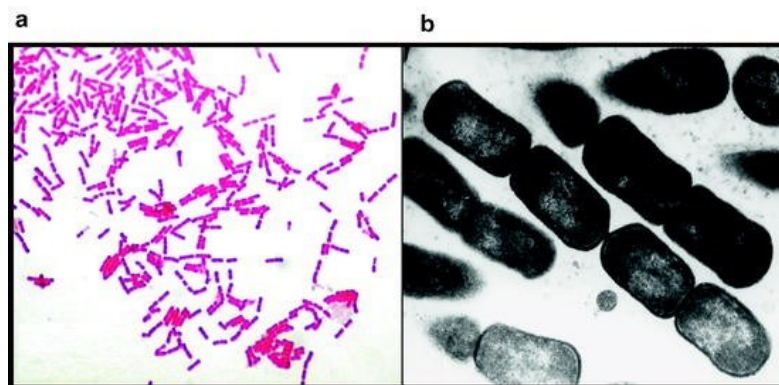
Kingella kingae je fakultativně anaerobní, gramnegativní kokobacilus z čeledi *Neisseriaceae* (obrázek č. 1, str. 11).¹ Poprvé byla tato bakterie izolována v roce 1960 z respiračních sekretů, krve, kostí a kloubů mikrobioložkou Elizabeth O. King, podle které byla bakterie *K. kingae* pojmenována.² Katalasové, ureasové a indolové testy jsou u *K. kingae* negativní a až na vzácné výjimky vykazuje oxidasovou aktivitu. Jediné sacharidy, které využívá k tvorbě kyselin jsou glukosa a maltosa. Na základě testů bylo potvrzeno, že hydrolyzuje indoxylfosfát a 1-propyl- β -naftylamid a vykazuje pozitivní reakce alkalické a kyselé fosfatasy.^{3,4} Obsahem mastných kyselin připomíná *K. denitrificans* a obsahuje rovněž vysoké procento kyseliny myristové a nižší koncentrace kyseliny palmitové, laurové, palmitolejové, linolové, olejové, 3-hydroxylaurové, 3-hydroxymyristové a cis-vakcenové.⁴

Donedávna byla *K. kingae* považována za vzácnou příčinu infekcí, ale díky pokroku bakteriologických kultivačních metod a molekulárních detekčních technik bylo odhaleno, že je tato bakterie významným invazivním pediatrickým patogenem.¹

K. kingae patří do skupiny orálních gramnegativních bakterií označovaných jako HACEK (*Haemophilus influenzae*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* a *K. kingae*), které sdílejí zvýšenou schopnost vyvolávat infekční endokarditidu.⁵ Přítomnost *K. kingae* byla klinicky prokázána také u pacientů se septickou artritidou, osteomyelitidou a bakteriemií, sporadicky také při infekcích dolních dýchacích cest a meningitidě.¹ Klinický průběh uvedených onemocnění, s výjimkou endokarditidy, je mírný.³ Vylepšení kultivačních technik a metod molekulární detekce potvrdilo bakterii *K. kingae* jako hlavní příčinu osteoartikulárních infekcí u dětských pacientů. Je přítomná v komenzální orofaryngeální flóře malých dětí a k jejímu přenosu dochází prostřednictvím blízkého osobního kontaktu nakažených osob.⁶

K nejohroženějším skupinám patří děti ve věku od 6 měsíců do 3 let.⁴ Výskyt *K. kingae* u starších dětí a dospělých osob postupně klesá, především díky silnější imunitě, která je schopná bakterii z hltnanu vymýtit.⁷ Děti ve věku do 6 měsíců mají výhodu mateřských ochranných protilátek, zatímco ve věku 6 až 48 měsíců je citlivost

způsobena relativní nezralostí imunitního systému, zejména pokud jde o vývoj protilátek namířených proti polysacharidové kapsuli.^{6,8} Toto pozorování také naznačuje, že izolace *K. kingae* z normálně sterilního místa u starších dětí by měla upozornit lékaře na možnost základní imunodeficience nebo endokarditidy indikující potřebu kardiologického vyšetření.^{9,10}



Obrázek č. 1: Mikroskopické snímky bakterie *K. kingae*. (a) *K. kingae* je gramnegativní kokobacilus vyskytující se ve formě párů nebo krátkých řetězců po 4 až 8 buňkách. (b) Snímek *K. kingae* z elektronového mikroskopu (zvětšení 10 000x) ukazující také váčky vnější membrány v jejím okolí.⁷

1.1.1 Antibiotika

Antibiotika, na které je *K. kingae* citlivá, jsou penicilin, ampicilin, cefalosporiny druhé a třetí generace, makrolidy, kotrimoxazol, ciprofloxacín, tetracykliny a chloramfenikol. Pro malé děti se používají empiricky podávaná β -laktamová antibiotika. *K. kingae* je plně rezistentní vůči trimetoprimu a vankomycinu a vykazuje sníženou citlivost vůči oxacilinu.¹¹⁻¹³

Čtrnáct prací zahrnujících 382 dětských pacientů uvádí délku antibiotické léčby a výsledek léčby u dětí s infekcí *K. kingae*.¹⁰ Délka antibiotické léčby se pohybovala od 7 do 21 dnů, a to jak pro medián, tak pro průměr intravenózní i perorální léčby. Intravenózní antibiotika byla podávána v rozmezí 7 až 14 dnů, zatímco perorální antibiotika v rozmezí 14 až 21 dnů. Většina studií uvádí dobré klinické a funkční výsledky po antibiotické léčbě bez závažných ortopedických následků.¹⁰

1.1.2 Mechanismus kolonizace hostitele

Předpokládá se, že patogenese onemocnění *K. kingae* začíná kolonizací horních cest dýchacích.³ Proces kolonizace zahrnuje adhezi bakterie *K. kingae* k buňkám respiračního epitelu prostřednictvím pilusu typu IV^{14,15} a také trimerního autotransportního proteinu Knh. *K. kingae* exprimuje polysacharidové pouzdro, jenž interferuje s adhezivní aktivitou Knh, pokud chybí pilusy typu IV.^{15,16}

Předpokládá se, že předcházející nebo souběžná virová infekce horních cest dýchacích je spojena s případy invazivního onemocnění *K. kingae*, což naznačuje, že při invazi bakterie do krevního řečiště může hrát roli poškození dýchacího epitelu viry.¹

Ačkoli v současné době není známa přímá souvislost mezi pilusy typu IV a invazí, bylo zjištěno, že izoláty *K. kingae* odebrané z horních cest dýchacích byly častěji piliované, než kmeny izolované z krve nebo kloubní tekutiny.¹⁵ Exprese pilusu u *K. kingae* je regulována třemi geny (σ gen, *pilS*, *pilR*).¹⁷ Zatímco většina kolonizačních kmenů i kmenů izolovaných z jedinců s bakteriemií exprimuje pilus na svém povrchu, kmeny izolované od pacientů z kostí, kloubů nebo při infekci endokardu pilus netvoří.¹⁸ Toto pozorování naznačuje, že tvorba pilusu poskytuje selektivní výhodu v procesu kolonizace právě v počátečních fázích na sliznicích a v krevním řečišti, zatímco při invazi do hlubších tělesných tkání není pro bakterii výhodná.¹⁸

Zajímavé je, že adhezin asociovaný s pilusy, PilC1, zprostředkovává adhezi bakterie k proteinům extracelulární matrix (ECM), lamininu a kolagenu IV, které se nacházejí v bazální membráně pod epiteliálními buňkami, a také ke kolagenu I, který tvoří intersticiální vrstvu pojivové tkáně pod bazální membránou.¹⁹ Tyto složky ECM mohou být po poškození epitelu obnaženy, což může být pro *K. kingae* cestou k invazi a přístupu do krevního řečiště.¹⁶

Je známé, že poškození respirační a ústní sliznice umožňuje hematogenní šíření bakterií do vzdálených orgánů těla, zejména do kosterní soustavy.²⁰ Výzkum virulence *K. kingae* byl výrazně omezen nedostatkem informací o genomu a nutričně náročným charakterem organismu. Teprve nedávno byl učiněn určitý pokrok v pochopení mechanismů virulence *K. kingae*. Důležitá role ve virulenci bakterie *K. kingae* je připisována produkci toxinu RtxA, který patří do široké skupiny RTX (z angl.

repeats in toxin) cytotoxinů produkovaných gramnegativními bakteriemi.²¹ Díky tomu se gen kódující RtxA používal jako specifický molekulární marker pro diagnostiku infekcí *K. kingae*.^{5,22,23} Avšak v roce 2017 byl popsán nový druh rodu *Kingella*, *K. negevensis*, a analýza jeho genomu odhalila přítomnost *rtx* lokusu, který je vysoce homologní s *rtx* lokusem *K. kingae* (kmeny ATCC 23330 a KWG1). Proto molekulární testy zaměřené pouze na *rtx* lokus nemohou rozlišit mezi *K. kingae* a *K. negevensis*.^{23,24}

1.1.3 Vliv *K. kingae* na hostitelské buňky

Předchozí výzkum odhalil, že *K. kingae* působí cytotoxicky na kultivované buňky respiračního epitelu, makrofágy, buňky kostního osteosarkomu nebo synoviální buňky. Bylo prokázáno, že za tento cytotoxický účinek je zodpovědný sekretovaný cytolyzin RtxA.²¹ Lokus *rtx* zahrnující geny pro syntézu, aktivaci a sekreci RtxA byl skutečně identifikován u všech testovaných klinických izolátů *K. kingae*, a také u nového druhu *K. negevensis*.^{23,25} Kromě toho experimenty na potkaních mláďatech infikovaných kmenem *K. kingae* PYKK081 a jeho izogenním mutantem KKNB100 s deficitem RtxA prokázaly, že cytotoxin RtxA je klíčovým faktorem virulence *K. kingae*.²⁶

V posledních dvou desetiletích se podařilo získat mnoho poznatků o repertoáru faktorů virulence *K. kingae* a tyto informace mohou být podkladem pro prevenci onemocnění způsobených touto bakterií. Přístupy k zabránění adheze *K. kingae* k respiračnímu epitelu prostřednictvím narušení pilusu typu IV a/nebo Knh by mohly být životaschopnou strategií k zabránění kolonizace. Vzhledem k tomu, že polysacharidové kapsule mnoha bakteriálních patogenů, jako např. *Haemophilus influenzae* typu b, *Streptococcus pneumoniae* a *N. meningitidis*, byly úspěšně začleněny do vysoce účinných glykokonjugovaných vakcín, dá se předpokládat, že stejný přístup by mohl být aplikován i u *K. kingae*. Vzhledem k tomu, že více než 95 % invazivních izolátů *K. kingae* nese pouze dva typy kapsule (typy a a b),²⁷⁻²⁹ glykokonjugovaná vakcína obsahující polysacharidy z těchto dvou typů kapsul by mohla potenciálně zabránit naprosté většině invazivních onemocnění způsobených bakterií *K. kingae*.¹⁶

1.1.4 Kultivace *K. kingae*

Bakterii *K. kingae* lze pěstovat na běžném sójovém agaru s 5 % hemoglobinem obohaceným tryptikasou, dále také na čokoládovém agaru, Columbia krevním agaru,³⁰ základním médiu Gonococcal (GC) agaru, a stejně jako mnoho dalších bakterií z rodů čeledi *Neisseriaceae*, také na Thayer-Martinově médiu.⁴ Pokud jde o MacConkey agar a Kriglerov agar, *K. kingae* není schopná růst na těchto agarech.⁴ Muellerovo-Hintonovo médium doplněné o kationty se využívá pro stanovení citlivosti *K. kingae* k antibiotikům, bylo ale prokázáno, že mnohé izoláty vykazovaly v daném médiu špatný růst. U mnohých bakterií, které kolonizují dýchací cesty, včetně *K. kingae*, se růst kultur zlepšuje za přítomnosti 5 % CO₂ v atmosféře.^{1,3}

Pro různé kmeny *K. kingae* je růst kolonií na pevném médiu charakterizován vytvořením zřetelné jamky na povrchu agaru, která je lépe pozorovatelná po odstranění kolonie.⁴ Podle stupně vyvinutého pilusu můžeme pozorovat tři typy kolonií: 1) expandující korodující typ, charakterizovaný malou centrální kolonií obklopenou širokým okrajem, 2) neexpandující nekorodující typ, tvořený plochou kolonií obklopenou úzkým okrajem a 3) kopulovité kolonie bez nápadného okraje. První dva typy kolonií jsou charakterizovány kmeny se specifickými dlouhými pilusy, zatímco třetí skupina kolonií je charakterizována kmeny, které pilusy netvoří.^{14,18,31,32} Po opakované subkultivaci může být schopnost tvořit kolonie s expandujícím korodujícím typem morfologie nenávratně ztracena.^{4,33}

1.1.5 Epidemiologie *K. kingae*

Z 2308 případů svalových a kosterních infekcí u dětí (mladších než 18 let) shromážděných z 29 publikací, byla celkem u 711 (30,8 %) pacientů úspěšně identifikována bakterie *K. kingae*. Kalkulací četnosti infekcí vyvolaných bakterií *K. kingae* bylo zjištěno, že z 1070 dětí mladších než 48 měsíců byla diagnostikována infekce způsobená *K. kingae* u 509 (47,6 %) pacientů.¹⁰ Francouzská skupina v retrospektivní studii zaznamenala výskyt *K. kingae* u 14 % diagnostikovaných bakteriálních osteoartikulárních infekcí u dětí. Autoři zaznamenali, že *Staphylococcus aureus* byl nejčastěji izolovanou bakterií u dětí starších než 36 měsíců, zatímco *K. kingae* byla izolována pouze u dětí mladších než 36 měsíců.³⁴ Ve francouzském pediatrickém

centru pak jiná skupina zaznamenala, že při osteoartikulárních infekcích bylo 14 % případů způsobených *K. kingae*,²² přičemž *Staphylococcus aureus* (47 %) a *Streptococcus pyogenes* (16 %) se vyskytovaly u dětí, jejichž věk se pohyboval od 9 do 90 měsíců s mediánem 17,9 měsíce.³⁵ Autoři také popisují klasický výskyt osteoartikulární infekce způsobené *K. kingae* u dětí ve věku od 6 měsíců do 4 let.^{1,22,35,36} Novější studie využívající kombinaci konvenční kultivace a PCR ukázaly, že *K. kingae* je nejčastější příčinou osteoartikulární infekce u dětí mladších 4 let. Na základě srovnání studií pak bylo zjištěno, že průměrný věk dětí činí 17,73 měsíců.¹⁰

Z 520 sledovaných dětských pacientů, u nichž byly identifikovány infekce způsobené *K. kingae* a u nichž studie uváděly místa infekce, se velká část případů (65 %) týkala infekcí kloubů. Následovalo 18,4 % osteoartikulárních infekcí (současné postižení kostí a kloubů), s izolovaným postižením kostí a páteře v 11,9 %, a 3,5 %. Francouzské studie uvádějí bakterii *K. kingae* jako nejčastějšího původce septické artritidy (Chometon a spol. 45 %, ²⁰ Ilharreborde a spol. 52 %^{20,37,38} a Aupiais a spol. 69 %³⁷) u malých dětí. Většina studií, které identifikovaly pohlaví, uváděla převahu mužů (60,5 %). Velká část pacientů s infekcí *K. kingae* byla také diagnostikována v období od podzimu do zimy. Avšak mnohé další studie potvrdily pozorovaný jednotný sezónní vzorec, který poukazuje na vyšší incidenci mezi lednem a květnem s vrcholem mezi únorem a dubnem na severní polokouli.³⁵ Sezónní kolísání infekce bakterií *K. kingae* pravděpodobně reflektuje souvislost s virovými infekcemi horních cest dýchacích a stomatitidou, což umožňuje průchod kolonizující *K. kingae* skrze narušený epitel.¹⁰

1.2 RTX toxiny

Aby *K. kingae* pronikla do krevního oběhu, musí v místě kolonizace prolomit epiteliální bariéru. Na translokaci přes epiteliální bariéru a vstupu do krevního řečiště se pravděpodobně podílí více faktorů, včetně toxinu RtxA, který poprvé identifikovali a charakterizovali Thomas E. Kehl-Fie a Joseph W. St. Geme III v roce 2007.²¹ Mutantní kmen, který postrádá RtxA, je nehemolytický a necytotoxický *in vitro* a je avirulentní na modelu invazivního onemocnění u potkaních mláďat,²⁶ což ukazuje na roli tohoto toxinu jako jednoho z hlavních faktorů virulence bakterie *K. kingae*.

Pórotvorné RTX toxiny představují skupinu cytotoxinů/cytolyzinů s různými biologickými funkcemi. Jsou sekretovány mnoha gramnegativními patogenními

bakteriemi z rodů *Actinobacillus*, *Aggregatibacter*, *Bordetella*, *Escherichia*, *Kingella*, *Mannheimia*, *Moraxella*, *Morganella*, *Pasteurella*, *Proteus* a *Vibrio*, a podílejí se na infekčních onemocněních způsobených uvedenými patogeny.^{39,40}

RTX toxiny jsou velké proteinové toxiny s molekulovou hmotností mezi ~100 až 200 kDa (cytotoxin RtxA *K. kingae* 105 kDa; α -hemolyzin HlyA uropatogenní *E. coli* 110 kDa; adenylátcyklasový toxin CyaA *B. pertussis* 177 kDa), které jsou tvořeny jediným polypeptidovým řetězcem bez cysteinových zbytků.^{23,40} Zatímco některé RTX toxiny, jako je α -hemolyzin HlyA a adenylátcyklasový toxin CyaA, byly v posledních desetiletích intenzivně studovány, cytotoxin RtxA je jedním z nejméně charakterizovaných členů rodiny RTX toxinů.²³

Bylo ukázáno, že klasické RTX toxiny, původně klasifikované jako leukotoxiny a hemolyziny, pronikají do membrány hostitelské buňky a zvyšují její permeabilitu tvorbou pórů propustných pro kationty.^{23,40}

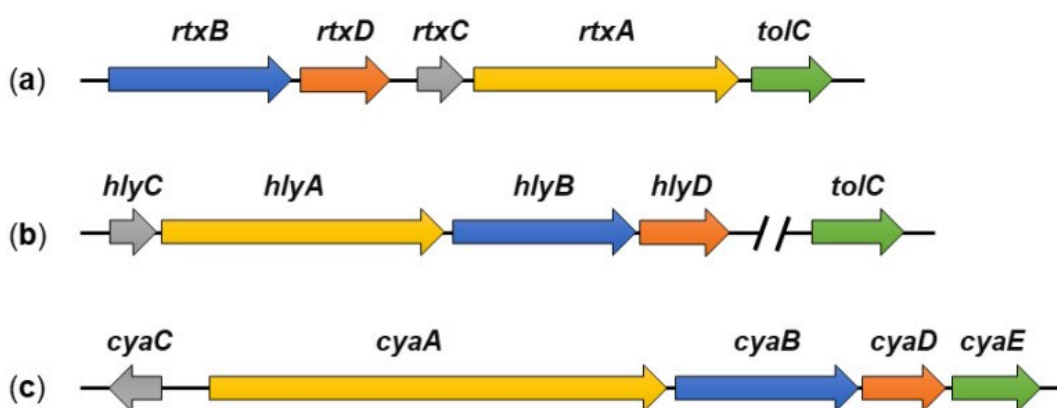
1.2.1 Lokus *rtx*

Lokus *rtx* *K. kingae* obsahuje pět genů, jmenovitě *rtxA*, *rtxB*, *rtxC*, *rtxD* a *tolC* (obrázek č. 2, str. 17), které jsou nezbytné pro produkci, aktivaci a sekreci toxinu RtxA.²¹ Gen *rtxA* kóduje neaktivní formu toxinu zvanou protoxin (proRtxA), která je aktivována acyltransferasou RtxC, kódovanou genem *rtxC*.²¹ Zbývající tři geny kódují proteiny RtxB, RtxD a TolC, které tvoří sekreční systém typu 1 (T1SS) nezbytný pro transport toxinu RtxA z cytosolu přes bakteriální membránu do extracelulárního prostředí.⁴ Lokus *rtx* bakterie *K. kingae* je lemován inzerčními elementy homologními s inzerčními elementy bakterie *Moraxella bovis*. Kromě toho jsou geny *rtxA*, *rtxC* a *rtxB* *K. kingae* z více než 70 % identické s příslušnými geny *M. bovis*. Geny *rtxD* a *tolC* jsou pak z 64 % a 81 % identické s jejich homology z bakterie *Neisseria meningitidis*. Lze tedy předpokládat, že *rtx* lokus *K. kingae* byl získán horizontálním přenosem genů.^{4,21,23,41}

Obdobně jako u RtxA je produkce, aktivace a sekrece ostatních RTX toxinů závislá na přítomnosti pěti *rtx* genů (obrázek č. 2, str. 17). Zatímco v případě *K. kingae* kmene 269-492 se nachází všech pět *rtx* genů v rámci jednoho genového lokusu, v případě *E. coli* se gen *tolC* nachází mimo *hly* lokus, který kóduje proteiny

HlyCABD.^{40,42-44} U *B. pertussis* je gen *cyaC* kódující acyltransferasu CyaC dokonce exprimován z opačného vlákna DNA než geny lokusu *cyaABCE*.^{40,42,45}

O regulačních mechanismech řídících transkripci genu *rtxA* je toho známo poměrně málo. Nedávno bylo ukázáno, že exprese *rtxA* je přinejmenším částečně ovlivněna fázovými změnami. Fázově proměnné proteiny Mod řídí koordinované přepínání exprese více genů,⁴⁶ a tím pomáhají zvyšovat adaptabilitu bakterií. Fázová změna je u bakterie *K. kingae* zprostředkována fázově variabilní DNA metyltransferasou typu III, ModK.^{16,23,47}



Obrázek č. 2: Genetická organizace *rtx* lokusů. Schematické znázornění *rtx* lokusu (a) kmene *K. kingae* 269–492, (b) kmene *E. coli* CFT073 a (c) kmene *B. pertussis* 18323. Barevné šipky představují kódující oblasti a směry transkripce *rtx* genů kódujících protoxin proRTXA (žlutá), acyltransferasu RTXC (šedá) a proteiny T1SS (ABC transportér (z angl. ATP-binding cassette; modrá); membránový fúzní protein, MFP (z angl. membrane fusion protein; oranžová); protein vnější membrány, OMP (z angl. outer membrane protein; zelená)).²³

1.2.2 Společné znaky RTX toxinů

Všechny typy RTX toxinů sdílejí několik homologních strukturních a funkčních domén a segmentů (obrázek č. 3, str. 18)^{40,42} :

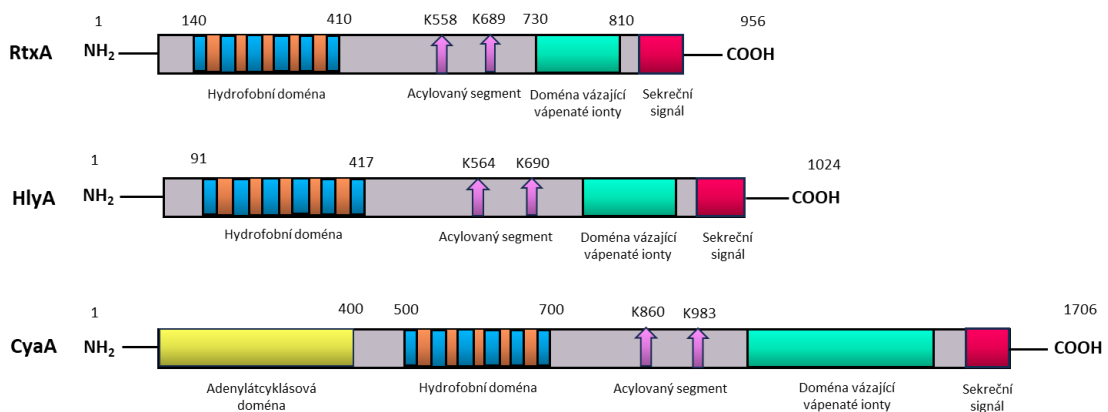
1. N-koncová hydrofobní doména, která obsahuje několik predikovaných transmembránových α -helixů, které jsou nezbytné pro inzerci RTX toxinu do membrány hostitelské buňky a tvorbu membránových pórů.

2. Acylovaný segment v centrální části molekuly, nesoucí dva konzervované lysinové zbytky, které jsou acylovány specifickou acyltransferasou RTXC. Acylací je RTX protoxin aktivován a přeměněn na funkční RTX toxin.

3. C-koncová repetitivní (RTX) doména, která nese různý počet opakujících se konzervovaných nonapeptidových sekvencí s konsenzuálním motivem G-G-X-G-X-D-X-U-X (X představuje libovolný zbytek a U představuje hydrofobní zbytek leucinu, valinu nebo isoleucinu), které tvoří vazebná místa pro vápenaté ionty. RTX toxiny vyžadují fyziologickou koncentraci vápenatých iontů (>1 mM) pro správné složení a biologickou aktivitu na hostitelských buňkách. Právě společná přítomnost těchto opakujících se sekvencí (repeticí) stojí u zrodu historického názvu rodiny RTX proteinů, kde RTX znamená v angl. repeats in toxin, tedy opakování v toxinu.

4. C-koncový sekreční signál pro export RTX toxinu z cytosolu bakteriální buňky do extracelulárního prostředí pomocí T1SS. RTX toxiny jsou sekretovány jednokrokovým mechanismem a sekreční signál není během sekrece odštěpován.

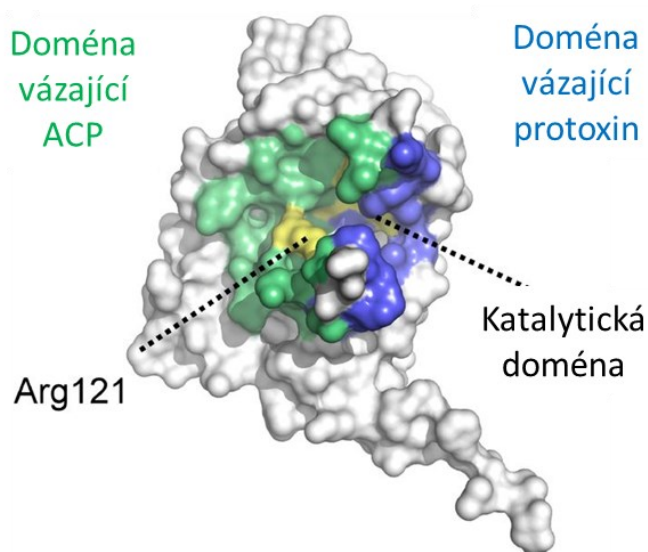
Jedinou výjimkou v uspořádání typických RTX toxinů je toxin CyaA bakterie *B. pertussis*, u něhož je k N-konci RTX hemolyzinu napojena enzymová adenylátcyklasová (AC) doména, a to prostřednictvím specifického AC-Hly linkeru nezbytného k přenosu AC domény do cytosolu hostitelské buňky.^{40,48}



Obrázek č. 3: Schematické znázornění struktury RTX toxinů RtxA, HlyA a CyaA. Tyto toxiny se skládají z hydrofobní domény (modro-oranžová), acylovaného segmentu se dvěma konzervovanými acylovanými lysinovými zbytky (označeno dvěma růžovými šipkami), RTX domény vázající vápenaté ionty (zelená) a C-koncového sekrečního signálu (červená). Na rozdíl od všech ostatních RTX toxinů obsahuje CyaA unikátní adenylátcyklasovou doménu (žlutá). Čísla nad jednotlivými toxiny značí pozice aminokyselinových zbytků.

1.2.3 Struktura acyltransferas

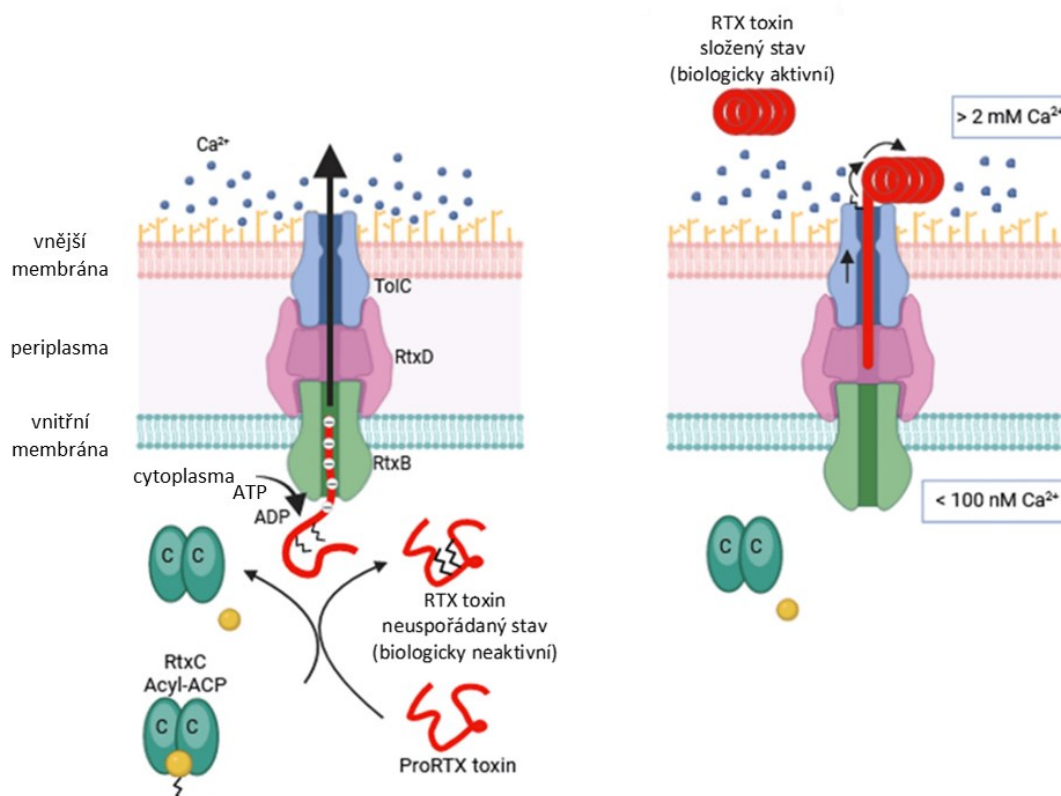
RTX toxiny se vkládají do membrán hostitelských buněk, v nichž tvoří kation-selektivní póry narušující iontovou homeostázu buněk, což vede k apoptóze a lýze buněk.⁴⁹ Jsou syntetizovány v neaktivní formě protoxinů, které vyžadují aktivaci v bakteriálním cytosolu.³⁹ Mechanismus aktivace spočívá v kovalentní acylaci dvou konzervovaných lysinových zbytků protoxinu prostřednictvím specifické acyltransferasy, která využívá acyl přenášejíci protein (ACP) jako donor mastných kyselin. U toxin-aktivující acyltransferasy (TAAT) ApyC z bakterie *A. pleuropneumoniae* byla stanovena rentgenová struktura s rozlišením 2,15 Å (obrázek č. 4). Struktura dané acyltransferasy se jeví jako rozpustný dimer. Bylo prokázáno, že bakteriální TAAT jsou strukturálně homologickou rodinou, která tvoří samostatnou větev nadrodiny enzymů GNAT (z angl. Gcn5-like N-acetyl transferase), které obvykle využívají acyl-CoA k modifikaci různých bakteriálních, archeálních a eukaryotických substrátů.⁵⁰



Obrázek č. 4: Monomer ApxC. Navrhované umístění vazebných míst pro acyl-ACP a protoxin na opačných stranách enzymu TAAT (vazebné místo pro ACP zeleně; vazebné místo pro protoxin modře). Předpokládá se, že se substráty setkají v kříži rozděleného β -listu, kde se nacházejí katalytické zbytky (žlutě). Označený je Arg121, u kterého se předpokládá, že je nezbytný pro vazbu s ACP.⁵⁰

1.2.4 Sekrece RTX toxinů pomocí T1SS

T1SS je mezi gramnegativními bakteriemi velmi rozšířený a podílí se na sekreci různých proteinů včetně RTX toxinů.⁵¹ T1SS se skládá ze tří membránových proteinů (obrázek č. 5, str. 21), z nichž se dva nachází ve vnitřní membráně a třetí ve vnější membráně: (i) transportéru ABC produkovaného genem *rtxB*; (ii) membránového fúzního proteinu MFP, produkovaného genem *rtxD* a (iii) vnějšího membránového proteinu OMP z rodiny proteinů TolC produkovaného genem *tolC/rtxE*.^{23,51} Proteiny vnitřní membrány patří do rodiny ABC transportérů, respektive do rodiny proteinů membránové fúze, jejichž struktura má kromě transmembránového segmentu také velkou periplazmatickou doménu. Na druhé straně, OMP je protein podobný porinu a prochází skrze vnější bakteriální membránu a rozprostírá se především v periplazmatickém prostoru. Počáteční rozpoznání neštěpeného C-koncového sekrečního signálu RTX toxinu transportérem ABC a MFP spustí sestavení funkčního transmembránového komplexu prostřednictvím specifických interakcí mezi MFP a OMP v periplazmě. Tento transportní komplex prochází přes periplazmu a propojuje cytoplazmatické prostředí buňky s extracelulárním prostředím. Vytvoří se souvislý kanál z vnitřní membrány, přemostí periplazmu a finálně přechází do vnější membrány. Sekrece RTX toxinu probíhá v jednom kroku přímo z cytosolu do extracelulárního prostoru. energii pro sekreci zajišťuje hydrolýza ATP transportérem ABC.^{51,52} Zajímavé je, že funkce proteinů ABC a MFP je jedinečná pro T1SS, zatímco TolC je pleiotropní a má řadu dalších funkcí, např. v sekreci toxických molekul ven z bakteriální buňky.^{44,53,54} Většina substrátů T1SS obsahuje všechny informace potřebné pro zacílení polypeptidu do translokačního kanálu v C-koncovém sekrečním signálu.²³



Obrázek č. 5: Obecné schéma acylace a sekrece RTX toxinů. Neaktivní RTX protoxin (proRTX, červený) je v bakteriálním cytosolu přeměněn na aktivní formu acylací dvou konzervovaných lysinových zbytků. Acylace protoxinu je zprostředkována specifickou acyltransferasou RTXC (tmavě zelená), která přenáší acyl z acyl-ACP (z angl. acyl carrier protein, žlutý) na protoxin. Acylovaný RTX toxin je pak přímo sekretován přes obě membrány prostřednictvím TISS, který je tvořen ABC transportérem (světle zelený); MFP (růžový) a OMP (modrý).⁴⁸

1.2.5 Interakce RTX toxinů s hostitelskou buňkou

Na základě buněčné a druhové specifity byly RTX toxiny původně rozděleny na skupinu hemolyzinů a skupinu leukotoxinů. Zatímco u hemolyzinů byla prokázána toxicita vůči různým typům buněk izolovaných z různých savčích druhů, leukotoxiny vykazovaly poměrně vysoký stupeň buněčné a druhové specifity.^{21,55} Později se zjistilo, že tento rozdíl je způsoben tím, že hemolyziny rozpoznávají povrchové buněčné struktury jako jsou glykoproteiny, glykolipidy a/nebo membránový cholesterol, které jsou součástí všech savčích buněk, zatímco leukotoxiny se specificky vážou na β_2 integriny, které jsou exprimovány výhradně na povrchu leukocytů.²³⁴⁰

Později však bylo zjištěno, že některé promiskuitní RTX toxiny původně klasifikované jako hemolyziny, např. HlyA a CyaA, se přednostně vážou na leukocyty exprimující β_2 integriny.^{56,57} Bylo též zjištěno, že některé leukotoxiny, např. LtxA a LktA,

u nichž bylo původně prokázáno, že se specificky vážou na β_2 integriny leukocytů, vykazují detekovatelnou cytotoxickou aktivitu na β_2 integrin-negativních erythrocytech.^{58,59} Avšak zatímco se RTX toxiny vážou na buňky exprimující β_2 integrin s vysokou afinitou a saturovatelným způsobem, jejich vazba na β_2 integrin-negativní buňky má obvykle nízkou afinitu a není saturovatelná.⁵⁷

Interakce RTX toxinů s β_2 integriny byla doposud prokázána u pěti RTX toxinů: LtxA z *A. actinomycetemcomitans*, HlyA z *E. coli*, LktA z *M. haemolytica*, ApxIIIa z *A. pleuropneumoniae* a CyaA z *B. pertussis*.²³ β_2 integriny patří do integrinové rodiny skládající se z 24 heterodimerních adhezivních a signálních receptorů na povrchu buněk, které vážou různé rozpustné ligandy, proteiny extracelulární matrix a ligandy na povrchu buněk.^{60,61} Skupina β_2 integrinů se skládá ze čtyř heterodimerních transmembránových glykoproteinů se stejnou podjednotkou β_2 a čtyřmi různými podjednotkami α : $\alpha_L\beta_2$ (CD11a/CD18 nebo LFA-1), $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18, komplementový receptor 3 (CR3) nebo Mac1), $\alpha_X\beta_2$ (CD11c/CD18, p150/195 nebo CR4) a $\alpha_D\beta_2$ (CD11d/CD18). β_2 integriny hrají zásadní roli v různých funkcích leukocytů, jako je adheze buněk, produkce reaktivních forem kyslíku, fagocytóza atd. Narušení jejich exprese nebo funkce vede ke vzácnému imunodeficitnímu syndromu známému jako deficiencie adheze leukocytů, který se vyznačuje zvýšenou náchylností k rozvoji život ohrožujících bakteriálních a plísňových infekcí.^{23,60,61}

Jak již bylo zmíněno výše, RTX leukotoxiny mohou interagovat také s buňkami, které na svém povrchu nenesou β_2 integriny. Např. u leukotoxinu LtxA bylo prokázáno, že je schopen lyzovat také lidské a ovčí erythrocyty, které β_2 integriny na svém povrchu nemají. Množství LtxA potřebné k lýze erythrocytů je však vyšší než množství potřebné k lýze leukocytů, což svědčí o přítomnosti receptorů s nízkou afinitou k danému toxinu na povrchu erythrocytů.⁵⁸ Později bylo ukázáno, že LtxA rozpoznává na povrchu erythrocytů gangliosidy, na kterých je přítomná kyselina sialová.⁶² HlyA pak rozpoznává na povrchu lidských erythrocytů jako receptor glykoforin.⁶³

V případě RtxA se interakce s β_2 integriny nepodařila prokázat.⁶⁴ Bylo zjištěno, že lidské monocyty THP-1 exprimující β_2 integriny jsou odolnější vůči cytotoxickému působení RtxA než lidské buňky, které β_2 integriny postrádají (HLaC-78 a FaDu).³⁹ Další pokusy byly provedeny na CHO buňkách (buňky vaječnicků čínského křečka) stabilně exprimujících lidské β_2 integriny. Bylo prokázáno, že RtxA se váže a zabíjí CHO buňky

exprimující β_2 integriny se stejnou účinností jako CHO buňky, které β_2 integriny neexprimují.⁶⁴

Nicméně se podařilo prokázat, že RtxA na povrchu cílových buněk rozpoznává glykosylované struktury jako jsou glykoproteiny a gangliosidy. Odstranění N- a O-vázaných oligosacharidových řetězců z glykosylovaných struktur na povrchu buněk pomocí enzymů (PNGasa F, O-glykosidasa) nebo inhibicí glykosylace (tunikamycin, benzyl-2-acetamido-2-deoxy- α -D-galaktopyranosid) vedlo k signifikantnímu snížení vazby toxinu RtxA na povrch deglykosylovaných buněk a tím i ke snížení cytotoxické aktivity toxinu.⁶⁴ Pro potvrzení fyziologického významu glykanů na povrchu buněk pro cytotoxické působení RtxA, byla stanovena životaschopnost deglykosylovaných HLaC-78 buněk po přidání RtxA. Nukleové kyseliny byly barveny pomocí Hoechst 33258 a následně byla změřena průtoková cytometrie.³⁹ HLaC-78 neošetřené glykosidasou byly podstatně citlivější k usmrcení zprostředkovanému RtxA než buňky HLaC-78, které byly deglykosylovány neuraminidasou, PNGasou F nebo O-glykosidasou. Tyto výsledky ukazují, že cytotoxická aktivita RtxA závisí na glykosylaci cílových buněk.⁶⁴

Bylo prokázáno, že vazbu a cytotoxicitu RtxA je možné také významně snížit, pokud jsou buňky preinkubovány s neuraminidasou, která z glykosylovaných molekul odstraňuje periferní zbytky kyseliny sialové. To naznačuje, že zbytky kyseliny sialové, kovalentně navázané na různé povrchové struktury buněk (glykoproteiny, gangliosidy), jsou důležité pro vazbu a cytotoxickou aktivitu RtxA. Také bylo ukázáno, že vazba RtxA na buňky je částečně blokována volnou kyselinou sialovou.⁶⁴ Na základě predikčních návrhů je interakce mezi RtxA a cílovými buňkami zprostředkována kladně nabitými lysinovými a argininovými zbytky domény RTX RtxA a periferními, záporně nabitými zbytky kyseliny sialové spojenými s povrchovými strukturami buněk.⁶⁴

Dalším ze způsobů, jak mohou RTX toxiny interagovat s cílovou buňkou je vazba na membránový cholesterol. Pomocí různých metod bylo prokázáno, že kontrolní erytrocyty jsou citlivější na hemolytickou aktivitu HlyA než erytrocyty o cholesterol ochuzené. Později byla pomocí různých biochemických a biofyzikálních metod prokázána přímá interakce HlyA s cholesterolem, ale ne se sfingomyelinem.⁶⁵ Kromě toho bylo v sekvenci HlyA identifikováno 20 potenciálních vazebných motivů pro cholesterol (7 tzv. CRAC motivů a 13 invertovaných CARC motivů, tzv. CARC

motivů s konsenzuálním vzorem R/K-(X)(1-5)-Y/F-(X)(1-5)-L/V)).⁶⁶ Předpokládá se, že interakce HlyA s cholesterolem podporuje konformační stav toxinu, který umožňuje správné vložení toxinu do membrány a tvorbu pórů.⁶⁵

Pomocí různých biochemických a biofyzikálních metod bylo prokázáno, že membránový cholesterol je také důležitý pro vazbu a cytotoxickou aktivitu RtxA.³⁹ Byla pozorována silná vazba fluorescenčně značeného RtxA na obří unilamelární vezikuly (GUVs, z angl. giant unilamellar vesicles) složené ze 75 % 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-fosfocholinu (POPC) a 25 % cholesterolu, zatímco vazba toxinu na GUVs složené ze 100 % POPC byla poměrně slabá. Měření povrchové plazmonové rezonance pak potvrdilo silnější afinitu RtxA k membráně obsahující POPC s cholesterolem než k membráně s čistým POPC. V dalším experimentu pak erythrocyty ošetřené methyl- β -cyklodextrinem, který z membrán odstraňuje cholesterol, vázaly signifikantně nižší množství RtxA než neošetřené erythrocyty. Navíc, RtxA preinkubovaný s volným cholesterolem vykazoval značně nižší schopnost lyzovat erythrocyty než samotný toxin. RtxA se také vázal s 2 až 3krát vyšší účinností k jamce ELISA destičky potažené cholesterolem konjugovaným k BSA než k jamce potažené samotným BSA. Tyto pokusy ukázaly, že RtxA je schopen interagovat s cholesterolem přímo, a navíc nezávisle na přítomnosti dalších složek buněčné membrány. Pomocí analýzy primární sekvence RtxA bylo nalezeno pět potenciálních motivů pro vazbu cholesterolu (dva motivy CRAC a tři motivy CARC), které se nacházejí v blízkosti nebo v rámci hydrofobní domény tvořící póry.

Všechny výše shrnuté výsledky ukázaly, že glykosylované struktury na povrchu buněk a membránový cholesterol společně působí jako hlavní membránové komponenty, které RtxA využívá k interakci s cílovými buňkami.³⁹

1.2.6 Tvorba membránových pórů

První zprávu o tvorbě transmembránových pórů RTX toxinu publikovali v roce 1983 Jorgensen a spol.⁶⁷ Pro vysvětlení pozorované akumulace vápníku a úbytku draslíku v erythrocytech následkem působení HlyA autoři předpokládali, že toxin může v membráně buněk vytvářet kationt-specifické póry.⁶⁷ O tři roky později provedli Bhakdi a kolegové soubor experimentů, které skutečně ukázaly, že HlyA je schopen inzerce do lipidové dvojvrstvy a poškození buněčné membrány vytvořením hydrofilního

transmembránového póru.⁶⁸ Další studie potvrdily tyto prvotní experimenty a navíc ukázaly, že pro lytickou aktivitu RTX toxinů je nezbytná jejich N-koncová hydrofobní doména.⁶⁹⁻⁷³

Řada RTX toxinů, včetně RtxA, byla studována na úrovni jednotlivých pórů pomocí planárních lipidových dvojvrstev tvořených azolektinem.⁶⁹ Azolektin je směs lipidů ze sójových bobů obsahující zhruba stejný podíl fosfatidylcholinu, fosfatidylethanolaminu a fosfatidylinositolu spolu s menším množstvím dalších fosfolipidů a typických rostlinných lipidů, jako jsou mono- a di-galaktosylglyceridy.⁶⁹ Bylo ukázáno, že složení lipidové membrány ovlivňuje inzerci RTX toxinů, ale zatím nic nenavádí tomu, že by ovlivňovalo i jejich pórtvorné vlastnosti. HlyA z *E. coli* byl prvním a nejlépe prozkoumaným RTX toxinem na lipidových membránách.⁷⁴ Záznamy jednotlivých pórů HlyA v planárních lipidových membránách ukázaly, že toxin tvoří kation-selektivní póry s průměrnou vodivostí přibližně 500 pS.⁷⁵

RtxA z *K. kingae* sdílí 46% homologii primární sekvence s HlyA a v azolektinových membránách tvoří velmi podobné póry.⁶⁹ Vodivost jednotlivých pórů tvořených toxinem RtxA je navíc srovnatelná s vodivostí obecných difúzních porinů gramnegativních bakterií. Nicméně vodivost jednoho póru tvořeného RtxA, ale i jinými RTX toxiny se neřídí lineární funkcí vodivosti tak, jak je tomu obvykle u běžných difúzních porinů.⁷⁶ Navíc póry tvořené RtxA a dalšími RTX toxiny fluktuují mezi otevřeným a uzavřeným stavem. To znamená, že RtxA netvoří trvale otevřený pór, jak bylo zjištěno u většiny gramnegativních bakteriálních porinů a některých jiných toxinů, které nepatří do rodiny RTX toxinů. Jiné studie naznačují, že pór tvořený toxinem RtxA, podobně jako i jinými RTX toxiny, nepředstavuje rigidní strukturu a podléhá reverzibilním strukturálním změnám v závislosti na aplikovaném napětí.⁶⁹ V porovnání s ostatními RTX toxiny je kationtová selektivita pórů tvořených RtxA přibližně třikrát nižší (10 vs. 3,5; stanoveno jako poměr mezi propustností pro kationty a propustností pro anionty).⁶⁹

Průměr póru různých RTX toxinů byl podrobně studován pomocí experimentů s osmoprotektanty nebo pomocí propustností různých kationtů přes daný pór.^{68,71,74,75,77} Tyto molekuly byly již dříve použity k určení efektivních průměrů pórů, vložených do planárních lipidových dvojvrstev.⁶⁹ Získané výsledky ukázaly, že průměr póru RtxA je přibližně 1,9 nm, což je srovnatelné s průměrem pórů jiných RTX toxinů, jako jsou

například HlyA, ApxIA a ApxIIA. Naproti tomu CyaA z *B. pertusis* vykazoval zřetelně menší póry o průměru přibližně 0,8 nm.⁷⁸

Na základě současných poznatků se předpokládá, že pro tvorbu membránového póru je nezbytná oligomerizace dvou nebo více molekul RTX toxinu v membráně cílových buněk.²³ Navzdory skutečnosti, že studium oligomerizace RTX toxinů je komplikováno jejich přirozenou tendencí tvořit v roztoku neaktivní agregáty,⁷⁹ několik experimentálních faktů poukazuje na to, že RTX toxiny tvoří v membráně oligomerní póry:²³

1. Byla pozorována strmá závislost membránové vodivosti na koncentraci RTX toxinu v systému planárních lipidových membrán, kterou lze vysvětlit tak, že existuje asociačně-disociační rovnováha mezi nevodivými monomery a vodivými oligomery.⁷¹

2. Komplementační analýza neaktivních mutantních CyaA a HlyA vedla k částečnému obnovení jejich hemolytických aktivit. Kombinace zkrácených, nepřekrývajících se variant CyaA a HlyA obnovila schopnost toxinů permeabilizovat buněčnou membránu. Pokusy se zkrácenými variantami CyaA naznačily, že k funkčnímu doplnění může dojít prostřednictvím vápník-vázajících repetitivních sekvencí v C-koncové části molekuly toxinu.⁸⁰

3. Bylo ukázáno, že typ acylace CyaA moduluje schopnost toxinu tvořit oligomerní membránové póry, neboť hemolytická aktivita CyaA byla ovlivněna připojením různých typů acylových řetězců.^{71,81,82} Existuje také předpoklad, že acylové řetězce v HlyA podporují protein-proteinové interakce nezbytné pro oligomerizaci toxinu.⁸³

4. FRET analýza ukázala asociaci molekul CyaA v roztoku vedoucí k oligomerním komplexům.⁸⁴

5. Nejsilnější důkaz oligomerizace RTX toxinů byl podán v roce 2009, kdy FRET analýza toxinu HlyA odhalila jeho oligomerizaci v membránách ovčích erytrocytů⁸³ a oligomerní komplexy CyaA vytvořené v membránách erytrocytů byly detekovány pomocí imunitního značení a nativní elektroforézy v polyakrylamidovém gelu.⁸⁵

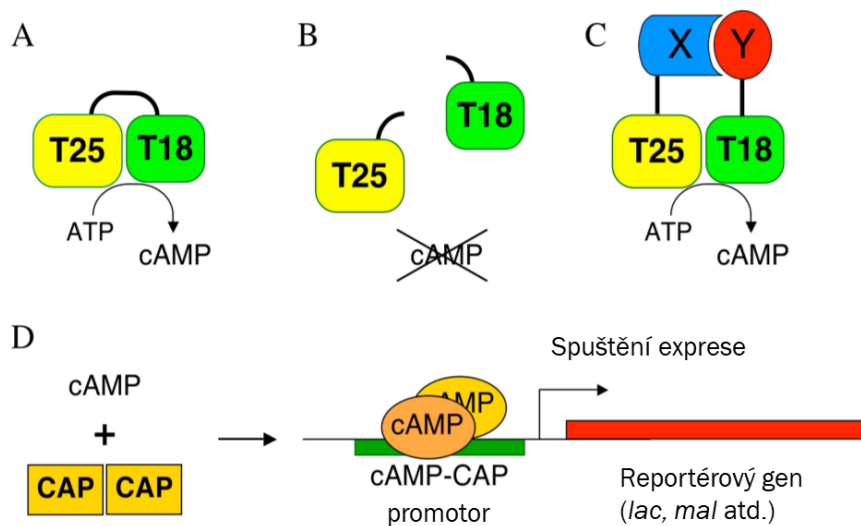
1.3 Dvouhybridní systémy

Dvouhybridní systémy jsou molekulárně biologické metody, které umožňují detekci a charakterizaci protein-proteinových interakcí *in vivo*. Specifické protein-proteinové interakce se podílejí na většině biologických procesů. Charakterizace těchto interakcí je proto nezbytná pro lepší pochopení živých organismů na molekulární úrovni.⁸⁶ V posledních desetiletích byly vypracovány různé dvouhybridní systémy nebo protein-komplementační testy (z angl. protein-complementation assays, PCA),^{87,88} jenž navazují na úvodní práci Fieldse a Songa, kteří navrhli kvasinkový dvouhybridní systém.⁸⁹ Všechny tyto techniky jsou založeny na společné expresi dvou hybridních proteinů v téže buňce, které po spojení vytvářejí charakteristický fenotyp.⁸⁷ V bakteriálním dvouhybridním systému (z angl. bacterial adenylate cyclase-based two-hybrid system, BACTH) vedou interakce k funkční komplementaci dvou fragmentů enzymu adenylátcyklasy, což způsobuje rekonstrukci signální dráhy cAMP v *E. coli*. Tato dráha aktivuje transkripci různých katabolických operonů, což vede k tvorbě selektivních fenotypů.⁹⁰ Na rozdíl od kvasinkového dvouhybridního systému, který vyžaduje specializované odborné znalosti, nabízí BACTH systém všechny výhody práce s *E. coli*: snadno dostupné mikrobiologické a molekulárně biologické techniky (příprava plazmidů, účinnost transformace, PCR). BACTH systém je zvláště vhodný pro analýzu interakcí mezi membránovými proteiny a ve vědecké komunitě se nyní široce používá jako nástroj pro charakterizaci protein-proteinových interakcí *in vivo*.^{91–93}

1.3.1 Bakteriální dvouhybridní systém

BACTH systém byl vyvinut skupinou D. Ladanta v Pasteurově institutu v Paříži v roce 1998 a využívá biochemických vlastností katalytické AC domény RTX toxinu CyaA z bakterie *B. pertussis*, původce černého kašle.⁹⁴ AC doména má modulární strukturu složenou ze dvou komplementárních fragmentů T25 a T18.^{95,96} Vzhledem k tomu, že aktivní místo enzymu se nachází na rozhraní T25/T18, jsou fragmenty při fyzickém oddělení neaktivní. Pokud jsou fragmenty T25 a T18 exprimovány v kmeni *E. coli cya⁻* (tj. bez endogenní AC) jako samostatné entity, nejsou schopny se navzájem rozpoznat a nemohou rekonstituovat funkční AC enzym. Pokud jsou části T25 a T18 geneticky spojeny s interagujícími polypeptidy, řekněme X a Y, heterodimerizace těchto

hybridních proteinů vede k funkční komplementaci mezi fragmenty T25 a T18 vedoucí k syntéze cAMP, který se váže na katabolický aktivační protein (z angl. catabolite activator protein, CAP), aktivátor katabolitů. Komplex cAMP/CAP je pleiotropním regulátorem genové transkripce v *E. coli*: aktivuje transkripci několika rezidentních genů, včetně genů operonů *lac* a *mal* zapojených do katabolismu laktosy a maltosy (obrázek č. 6).⁹⁷ Bakterie, které exprimují interagující hybridní proteiny, se proto stávají schopnými využívat laktosu nebo maltosu jako jediný zdroj uhlíku. Toto lze snadno sledovat na indikátorových a/nebo selektivních médiích. Kvantifikace relativní účinnosti komplementace lze navíc snadno dosáhnout měřením aktivity β -galaktosidasy v bakteriálních kulturách, protože exprese tohoto enzymu v *E. coli* je silně závislá na cAMP.^{90,98,99}



Obrázek č. 6: Princip BACTH systému. Katalytická AC doména toxinu CyaA z bakterie *B. pertussis* se skládá ze dvou komplementárních fragmentů, T25 a T18 (A), které nejsou aktivní, jestliže jsou fyzicky odděleny (B). Jakmile jsou tyto dva fragmenty fúzovány k interagujícím polypeptidům, X a Y, vede heterodimerizace těchto hybridních proteinů k funkční komplementaci mezi fragmenty T25 a T18, a tedy k syntéze cAMP (C). cAMP produkovaný rekonstituovaným AC enzymem se váže na katabolický aktivační protein CAP (D). Komplex cAMP/CAP je pleiotropním regulátorem genové transkripce v *E. coli*, který spouští expresi několika rezidentních genů, včetně genů *lac* a *mal* operonů zapojených do katabolismu laktosy a maltosy. Obrázek převzat z protokolu BACTH systému od firmy Euromedex, Paříž, Francie.

BACTH systém byl použit k charakterizaci interakcí mezi rozpustnými nebo membránovými proteiny prokaryotického, eukaryotického nebo virového původu. Systém lze použít k odhalení oblastí, domén nebo aminokyselinových zbytků proteinu, které se podílejí na interakci s konkrétním partnerem a lze jej také přizpůsobit pro vysoce

výkonný screening malých molekul schopných zasahovat do protein-proteinových interakcí. Proto si BACTH systém získal oblibu při studiu interakcí mezi membránovými proteiny a v současné době je široce využíván k charakterizaci molekulárních bakteriálních mechanismů zapojených do sekrece, signalizace, buněčného dělení, biogeneze buněčné stěny atd.^{93,99}

Výsledkem komplementace mezi fragmenty T25 a T18 je transkripční aktivace genů závislých na cAMP/CAP. D. Ladant ve své práci využil přirozeně se vyskytujících katabolických genů závislých na cAMP/CAP v *E. coli*. Uvedl také, že je snadné navrhnout specifické reportérové kazety, ve kterých je jakýkoli gen našeho zájmu spojen s promotorem závislým na cAMP/CAP. V současné době se využívá takový systém pomocí genu rezistence vůči antibiotikům, což usnadňuje screening složitých knihoven jednoduchým výběrem na antibiotickou rezistenci. Alternativně by reportérový gen řízený cAMP/CAP mohl kódovat toxický produkt. To by mohlo být užitečné zejména při hledání chemických sloučenin nebo mutací, které ruší danou interakci mezi dvěma studovanými proteiny. Tento bakteriální systém tedy nabízí možnost jak pozitivní, tak negativní selekce, což jej činí obzvláště univerzálním.¹⁰⁰

1.3.2 Princip provedení dvouhybridního systému

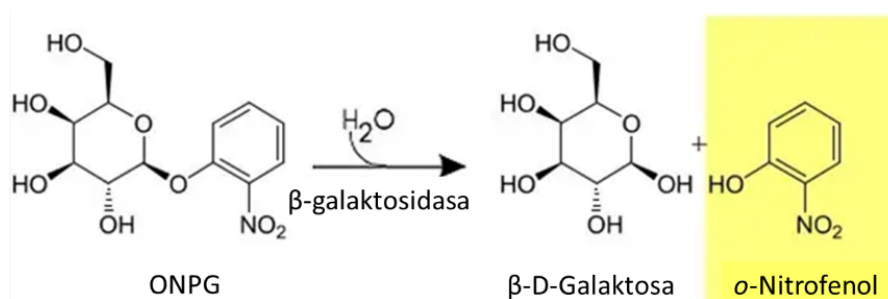
Charakteristika *in vivo* interakcí mezi dvěma sledovanými proteiny je snadno dosažena pomocí BACTH systému po třífázové proceduře, zahrnující:⁹³

1. Konstrukce rekombinantních plazmidů exprimujících dva testované proteiny (např. X a Y), které jsou na genetické úrovni fúzovány s fragmenty T25 a T18. Toto je provedeno standardními molekulárně biologickými technikami. Různé vektory určené pro expresi fragmentů T25 (pKT25 nebo pKNT25) a T18 (pUT18 nebo pUT18C) lze použít k přípravě hybridních proteinů s testovanými proteiny, fúzovanými buď na N- nebo C-konec fragmentů T25 a T18.

2. Kotransformace dvojice plazmidů kódujících příslušné fúzní proteiny do reportérových kmenů *E. coli* *cya*⁻. Kotransformované buňky jsou pěstovány na médiu s indikátorem nebo na selektivním médiu pro lepší odhalení výsledného fenotypu *Cya*⁺. Pro zjištění platnosti testu by měly souběžně probíhat vhodné kontroly BACTH systému, např. testy s plazmidy exprimujícími neinteragující fragmenty.

3. Účinnost komplementace mezi specifickými hybridními proteiny lze pak snadno kvantifikovat měřením β -galaktosidasové aktivity v bakteriálních extraktech pomocí mnoha známých, barevných (*o*-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid, ONPG) nebo fluorescenčních substrátů. Produkce cAMP je přímo úměrná enzymové aktivitě rekonstituované adenylátcyklasy. cAMP po navázání na CAP spouští expresi β -galaktosidasy, která katalyzuje hydrolýzu ONPG na *ortho*-nitrofenol (ONP) a β -D-galaktosu (obrázek č. 7). ONP má jasně žlutou barvu, která se detekuje spektrofotometricky při vlnové délce 420 nm. Koncentrace β -galaktosidasy je přímo úměrná intenzitě barvy.

Pro lepší charakterizaci vzájemně interagujících proteinů lze fúzní proteiny exprimované bakterií *E. coli* dále charakterizovat pomocí různých biochemických přístupů, jako jsou imunodetekce, imunoprecipitace, kopurifikace atd.⁹³



Obrázek č. 7: ONPG je umělý substrát, který se používá k měření enzymové aktivity β -galaktosidasy. ONPG je štěpený β -galaktosidasou na β -D-galaktosu a *ortho*-nitrofenol. *Ortho*-nitrofenol má jasně žlutou barvu, kterou lze měřit spektrofotometricky při 420 nm. Intenzita zabarvení je přímo úměrná množství β -galaktosidasy, které je přímo úměrné množství produkovaného cAMP, které je úměrné účinnosti interakce mezi testovanými proteiny fúzovanými s fragmenty T25 a T18.

1.3.3 Plazmidy využívané ve dvouhybridním systému

Technologie BACTH systému vyžaduje koexpresi dvou hybridních proteinů v rámci jedné bakteriální buňky *E. coli cya*⁻. Souprava BACTH systému od společnosti Euromedex poskytuje dvě různé sady kompatibilních vektorů, které umožňují genetickou fúzi testovaných proteinů buď na N- nebo C-konci fragmentu T18 (pUT18 a pUT18C) nebo fragmentu T25 (pKNT25 a pKT25) (obrázek č. 8, str 32).

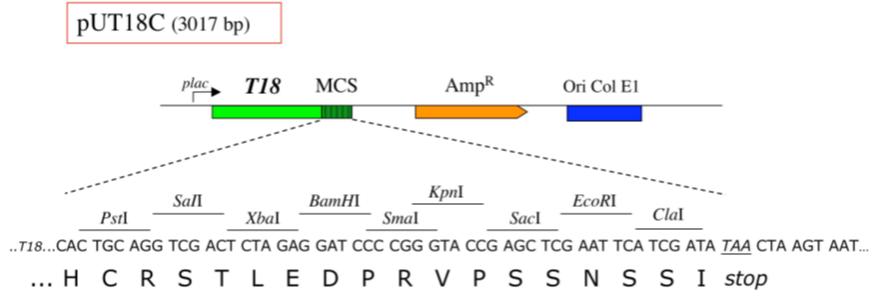
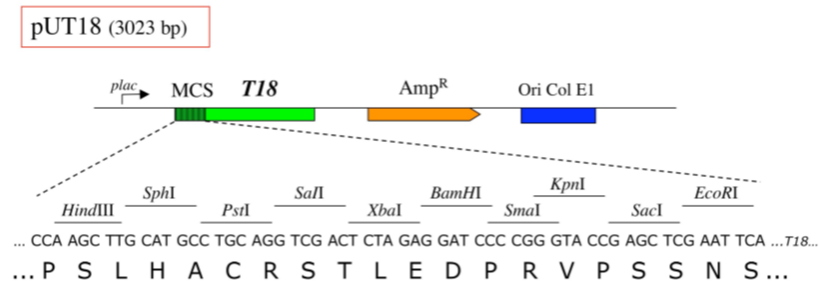
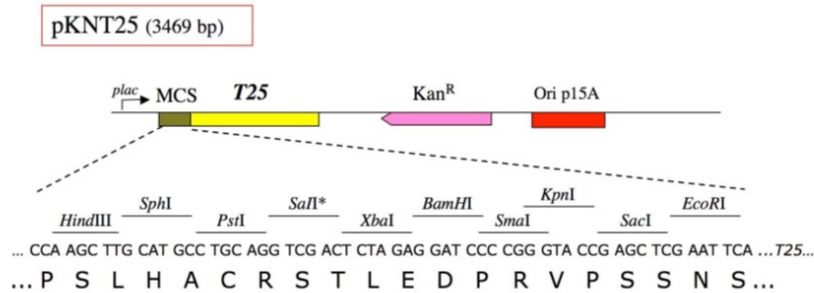
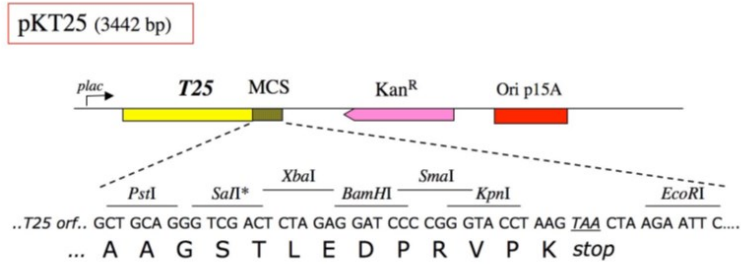
1. Vektor pKT25 nese DNA sekvenci, která je pod transkripční kontrolou *lac* promotoru a kóduje fragment T25 (odpovídá prvním 224 aminokyselinovým zbytkům CyaA). Vektor pKT25 je derivát nízkokopiového plazmidu pSU40, který nese gen pro rezistenci ke kanamycinu. Na 3'-konci DNA sekvence pro T25 je vloženo vícenásobné klonovací místo (z angl. multiple cloning site, MCS), které umožňuje vložení DNA sekvence kódující testovaný protein ve stejné fázi čtení jako je pro T25. To umožňuje produkci fúzního proteinu, v němž je fragment T25 fúzován na svém C-konci s testovaným proteinem (T25-testovaný protein).

2. Vektor pKNT25 nese DNA sekvenci, která kóduje fragment T25 a je také derivátem nízkokopiového plazmidu pSU40. MCS je vloženo na 5'-konci DNA sekvence pro T25. To umožňuje produkci fúzního proteinu, v němž je fragment T25 fúzován na svém N-konci s testovaným proteinem (testovaný protein-T25).

3. Vektor pUT18 nese DNA sekvenci, která je pod transkripční kontrolou *lac* promotoru a kóduje fragment T18 (odpovídá 225 až 399 aminokyselinovým zbytkům CyaA). Vektor pUT18 je derivát vysokokopiového plazmidu pUC19, který nese gen pro rezistenci vůči ampicilinu. Na 5'-konci DNA sekvence pro T18 je vloženo MCS, které umožňuje vložení DNA sekvence kódující testovaný protein ve stejné fázi čtení jako je pro T18. To umožňuje produkci fúzního proteinu, v němž je fragment T18 fúzován na svém N-konci s testovaným proteinem (testovaný protein-T18).

4. Vektor pUT18C nese DNA sekvenci, která kóduje fragment T18 a je derivátem vysokokopiového plazmidu pUC19. MCS je vloženo na 3'-konci DNA sekvence pro T18, což umožňuje produkci fúzního proteinu, v němž je fragment T18 fúzován na svém C-konci s testovaným proteinem (T18-testovaný protein).

Plazmidy pKT25-*zip* a pUT18C-*zip* slouží jako pozitivní kontroly pro komplementaci. Exprimují fúzní proteiny T25-*zip* a T18-*zip*, které mohou asociovat díky dimerizaci motivu leucinového zipu fúzovaného k fragmentům T25 a T18. Když jsou pKT25-*zip* a pUT18C-*zip* společně transformovány do bakteriálních buněk, obnovují charakteristický Cya⁺ fenotyp. BACTH systém využívá k detekci protein-proteinových interakcí dva kmeny *E. coli*, BTH101 a DHM1, které neprodukují endogenní AC.



Obrázek č. 8: Vektory pKT25 a pKNT25 (žluté), pUT18 a pUT18C (zelené). Vícenásobné klonovací místo (MCS) je buď na 5'- nebo 3'-konci DNA sekvence kódující fragmenty T25 a T18. Gen pro rezistenci ke kanamycinu je zobrazen růžově a gen pro rezistenci k ampicilinu oranžově. Obrázek převzat z protokolu BACTH systému od firmy Euromedex, Paříž, Francie.

2 Cíle diplomové práce

- Optimalizace podmínek použití bakteriálního dvouhybridního systému
- Testování proteinových interakcí mezi RtxC a acyl-ACP a mezi RtxC a RtxA
- Analýza vlivu záměn dvou konzervovaných lysinových zbytků RtxA na interakci s RtxC
- Mutageneze genů kódujících ACP a RtxA na základě predikce interagujících zbytků
- Testování vlivu substitucí vnesených do ACP a RtxA na interakci s RtxC

3 Přístroje a materiály

3.1 Přístroje

- Centrifuga – Sorvall LYNX 4000, Thermo Fisher Scientific, CZE
 - o Rotor – Thermo Scientific Fiberlite F20-12x50 LEX Rotor
- Digitální analytické váhy – Mettler, DEU
- Elektroforéza – 2303 Multidrive XL, Pharmacia Biotech, SWE
- Elektroforéza – MUPID One, Advance, CZE
- Laboratorní váhy – AJ 820CE, Vibra, JPN
- Lázeň – Velp Scientifica, ITA
- Mikrocentrifuga – Biofuge pico, Heraeus Instruments, DEU
- Mrazicí box (-80°C) – Jouan, FRA
- PCR cykler – Biometra TAdvanced Twin, Analytik Jena, DEU
- pH-metr – MV 870, Práctronick, DEU
- Spektrofotometr/fluorometr – DS-11 FX, DeNovix, SVK
- Tepelná třepačka – Thermo-Shaker TS-100C, Biosan, LVA
- UV transiluminátor – G:Box, Syngene, USA
- Vodní lázeň – Heating immersion circulators, Julabo, CZE
- Vodní lázeň – Water Bath GFL 1004 Incubation/Inactivation Bath, CZE
- Vortex – MS2 minishaker, IKA-Works, Inc., USA
- Vortex – Vortex V-1 plus, Biosan, LVA

3.2 Materiály

3.2.1 Použité chemikálie

- Akrylamid, Serva, DEU
- Ampicilin, Biotika, SVK
- Bakteriologický agar, Oxford, UK
- Deoxynukleotide (dNTP) Solution Mix, New England BioLabs, USA
- Dihydrogenfosforečnan draselný, Sigma-Aldrich, USA
- Dihydrogenfosforečnan sodný, Sigma-Aldrich, USA
- Dodecylsírán sodný (SDS), Serva, DEU
- Ethanol, Lach-Ner, CZE

- Ethidium bromid, Sigma-Aldrich, USA
- Gel Loading Dye Purple (6x), New England BioLabs, USA
- Glycerol, Sigma-Aldrich, USA
- Hydrogenfosforečnan sodný, Sigma-Aldrich, USA
- Chlorid sodný, Sigma-Aldrich, USA
- Izopropyl- β -D-1-tiogalaktopyranosid (IPTG), Sigma-Aldrich, USA
- Kanamycin, Biotika, SVK
- Kvasničný extrakt, Sigma-Aldrich, USA
- Kyselina boritá, Lachema, CZE
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), Sigma-Aldrich, USA
- Maltosa, Sigma-Aldrich, USA
- o-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid, EMD Millipore Corp., USA
- Síran amonný, Sigma-Aldrich, USA
- Síran hořečnatý, Sigma-Aldrich, USA
- Síran manganatý, Sigma-Aldrich, USA
- Síran železnatý, Sigma-Aldrich, USA
- Thiamin (vitamin B1), Sigma-Aldrich, USA
- Toluén, Sigma-Aldrich, USA
- Tris-HCl, Serva, DEU
- Uhličitan sodný, Sigma-Aldrich, USA
- β -merkapt ethanol, Sigma-Aldrich, USA
- λ -DNA, Thermo Fisher Scientific, USA

3.2.2 Použité roztoky

Roztoky pro elektroforézu

- TBE roztok
 - 90 mM Tris-HCl
 - 90 mM kyselina boritá
 - 2 mM EDTA (pH 8,3)
- BFB roztok
 - 0,25 % bromfenolová modř
 - 40 % glycerol

Roztoky pro práci s plazmidy:

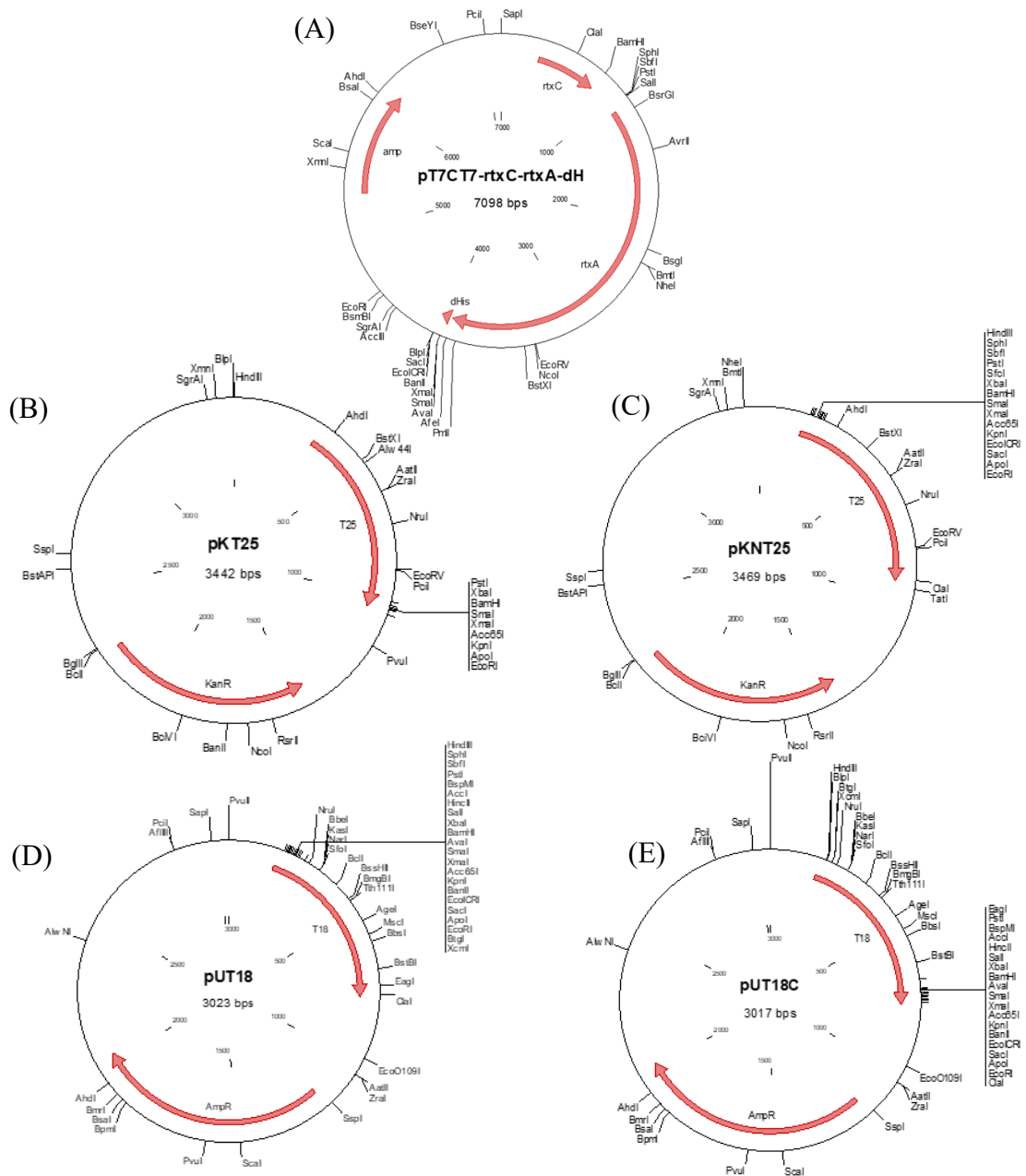
- PCR reakční pufr – Q5 HF Reaction Buffer, New England BioLabs, USA
- Ligační pufr – Quick Ligation Buffer, New England BioLabs, USA
- CutSmart pufr, New England BioLabs, USA

Roztoky pro BACTH systém

- M63 pufr 5 x ředěný, příprava do 1 l
 - 10 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 - 68 g KH_2PO_4
 - 2,5 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - 5 mg vitamin B1
- PM2
 - 70 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
 - 30 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
 - 1 mM MgSO_4
 - 0,2 mM MnSO_4
- Roztok pro spuštění enzymové reakce
 - 4 mg/ml ONPG (rozpuštěno v PM2 puftru)
- Roztok pro zastavení enzymové reakce
 - 1 M Na_2CO_3

3.2.3 Plazmidy

Plazmid pT7CT7-*rtxC-rtxA*-dH byl použit jako templát při amplifikaci genu *rtxA* během PCR mutageneze (obrázek č. 9, A, str. 37). Nachází se na něm gen pro rezistenci vůči ampicilinu, který se používá jako selekční marker. Plazmidy pKT25, pKNT25, pUT18 a pUT18C byly využity jako templáty pro PCR za účelem vnesení části genu pro testovaný protein. Takto připravené plazmidy byly využity v BACTH systému. Plazmidy pKT25 a pKNT25 (obrázek č. 9, B, C, str. 37) nesou gen pro rezistenci ke kanamycinu a plazmidy pUT18 a pUT18C (obrázek č. 9, D, E, str. 37) nesou gen pro rezistenci ke ampicilinu. Přítomnost daných genů se využívá jako selekční marker při pěstování buněk.



Obrázek č. 9: (A) plazmid pT7CT7-rxC-rxA-dH, (B) plazmid pKT25, (C) plazmid pKNT25, (D) plazmid pUT18, (E) plazmid pUT18C. Po okrajích jsou zobrazena unikátní klonovací místa, která lze štěpit pomocí vyznačených restričních endonukleas.

3.2.4 Primery

Všechny primery byly syntetizovány firmou GENERI BIOTECH s.r.o., sekvence je uvedena od 5'-konce k 3'-konci.

T18-ACP-For	GAACAATCCTTTCCCGGAGG
T18-ACP-Rev	CAAATAGGGGTTCCGCGCAC
D36AFor	GGCGCGGCTTCTCTTGACACCGTTGAGC
D36ARev	GTCAAGAGAAGCCGCGCCCAGGTCTTCAAC
D39AFor	GGATTCTCTTGCCACCGTTGAGCTGGTAATGG
D39ARev	CAACGGTGGCAAGAGAATCCGCGCCCAG
E42AFor	CACCGTTGCGCTGGTAATGGCTCTGGAAG
E42ARev	CCATTACCAGCGCAACGGTGTCAAGAGAATCC
E48AFor	GGCTCTGGCAGAAGAGTTTGATACTGAGATTCC
E48ARev	CAAACCTCTTCTGCCAGAGCCATTACCAGCTC
E49AFor	CTCTGGAAGCAGAGTTTGATACTGAGATTCCG
E49ARev	GTATCAAACCTCTGCTTCCAGAGCCATTACCAGC
D57AFor	GAGATTCCGGCCGAAGAAGCTGAGAAAATCAC
D57ARev	GCTTCTTCGGCCGGAATCTCAGTATCAAACCTC
E61AFor	GAAGAAGCTGCGAAAATCACACCAGTTTCAGG
E61ARev	GGTGATTTTCGCGAGCTTCTTCGTCCGGAATC
Nhelinfor	GGAAGCTAGCAAACAAGCAATGTTTGAAAGCG
BlpIRev	CATCGCCGCTGAGCTCAATG
R690LFor	CTTACAGAAACGCTCGAGTATCGCGATTTTGAATTAAAACG
R690LRev	GATACTCGAGCGTTTCTGTAAGTTTACCAACTTGTGTAGTTTG
E692LFor	GTAAACGTACACTAACGCTCGAGTATCGCGATTTTGAATTAAA ACG
E692LRev	CTCGAGCGTTAGTGTACGTTTACCAACTTGTGTAG
Y696LFor	CAGAAACGCTCGAGCTTCGCGATTTTGAATTAAAACGTC
Y696LRev	CGCGAAGCTCGAGCGTTTCTGTACGTTTACCAAC
R697LFor	GAAACGCTCGAGTATCTCGATTTTGAATTAAAACGTCCTG
R697LRev	CAAATCGAGATACTCGAGCGTTTCTGTACGTTTACCAAC
SphI-rtxA529-For	CGCGGCATGCCGCTAATGGTAAAAAACACAAGC
SacI-rtxA718-Rev	CGGCGAGCTCGGTTCTACTGATTTTAATGTATCAGTTG
BamHI-rtxA529-For	TAGAGGATCCCGCTAATGGTAAAAAACACAAGC

KpnI-rtxA718-Rev	CTTCGGTACCCGTTCTACTGATTTTAATGTATCAGTTG
HindIII-rtxC-For	CGCGAAGCTTAATGGATAAAATTTTCAGAACTAGGC
SacI-rtxC-Rev	CGGCGAGCTCGGTTTTGATGTAAGTATGATAAAATTATC
BamHI-rtxC-For	TAGAGGATCCCATGGATAAAATTTTCAGAACTAGGC
KpnI-rtxC-Rev	CTTAGGTACCCGTTTTGATGTAAGTATGATAAAATTATC
HindIII-acp-For	CGCCAAGCTTGATGAGCACTATCGAAGAACGCG
SacI-acp-Rev	CTTCGAGCTCGGCGCCTGGTGGCCGTTGATG
BamHI-acp-For	TAGAGGATCCCATGAGCACTATCGAAGAACGCG
KpnI-acp-Rev	CTTCGGTACCCGCGCCTGGTGGCCGTTGATG
Kpn-rtxA623-Rev	CTTCGGTACCCGAAAATATCATCATTGCCCGAAC
BamHI-rtxA624-For	TAGAGGATCCCGCTGGTCAAGGTAAAATGAATG

3.2.5 Buňky

- *E. coli* XL1-Blue – Stratagene, USA
- *E. coli* DHM1 – Euromedex, FRA
- *E. coli* BTH101 – Euromedex, FRA

3.2.6 Použitá média

- LB médium
 - 10 g/l Bacto-trypton
 - 5 g/l kvasničný extrakt
 - 10 g/l NaCl
- MacConkey agar
 - 40 g/l MacConkey agar
 - 1 % maltosa

3.2.7 Použité sady

- Monarch DNA Gel Extraction Kit, New England BioLabs, USA
- BACTH System Kit, Euromedex, FRA
- High-Speed Plasmid Mini Kit, Geneaid, TWN
- Quick Ligation™ Kit, New England BioLabs, USA

3.2.8 Enzymy

- Fosfatasa (QuickCIP, Calf intestinal phosphatase), New England BioLabs, USA
- Ligasa (Quick Ligase), New England BioLabs, USA
- Polymerasa (Q5 High-Fidelity DNA Polymerase) New England BioLabs, USA

Restrikční endonukleasy:

Tabulka č. 1: Restrikční endonukleasy využitě pro vkládání DNA fragmentů do uvedených plazmidů a k jejich následné analýze, New England BioLabs, USA

Plazmid	Restrikční endonukleasy	
pU- <i>rtxA529-718-T18</i>	SphI, SacI	NcoI, AgeI
pUT18C- <i>rtxA529-718</i>	BamHI, KpnI	NcoI, AgeI
pKN- <i>rtxC-T25</i>	HindIII, SacI	
pKT25- <i>rtxC</i>	BamHI, KpnI	
pU- <i>acp-T18</i>	HindIII, SacI	
pUT18C- <i>acp</i>	BamHI, KpnI	
pUT18C- <i>rtxA529-623</i>	BamHI, KpnI	HindIII
pUT18C- <i>rtxA624-718</i>	BamHI, KpnI	HindIII, NcoI
pUT18C- <i>acp-D36A</i>	AgeI-HF, AatII	
pUT18C- <i>acp-D39A</i>	AgeI-HF, AatII	
pUT18C- <i>acp-E48A</i>	AgeI-HF, AatII	
pUT18C- <i>acp-D49A</i>	AgeI-HF, AatII	
pUT18C- <i>acp-D57A</i>	AgeI-HF, AatII	
pUT18C- <i>rtxA529-718-K558R</i>	BamHI, KpnI	MluI-HF, BlnI
pUT18C- <i>rtxA529-718-K558Q</i>	BamHI, KpnI	XhoI, BlnI
pUT18C- <i>rtxA529-718-K689R</i>	BamHI, KpnI	XhoI, BlnI
pUT18C- <i>rtxA529-718-K689Q</i>	BamHI, KpnI	HincII
pUT18C- <i>rtxA529-718-K558R+K689R</i>	BamHI, KpnI	MluI-HF, BlnI
pUT18C- <i>rtxA529-718-K558Q+K689Q</i>	BamHI, KpnI	HincII
pUT18C- <i>rtxA529-623-K558R</i>	BamHI, KpnI	MluI-HF
pUT18C- <i>rtxA529-623-K558Q</i>	BamHI, KpnI	XhoI
pUT18C- <i>rtxA624-718-K689R</i>	BamHI, KpnI	XhoI
pUT18C- <i>rtxA624-718-K689Q</i>	BamHI, KpnI	HincII
pUT18C- <i>rtxA624-718-R690L</i>	BamHI, KpnI	XhoI, ScaI
pUT18C- <i>rtxA624-718-E692L</i>	BamHI, KpnI	XhoI, ScaI
pUT18C- <i>rtxA624-718-Y696L</i>	BamHI, KpnI	XhoI, ScaI
pUT18C- <i>rtxA624-718-R697L</i>	BamHI, KpnI	XhoI, ScaI

4 Metody

4.1 Příprava plazmidů s cílenou mutací v příslušném genu

4.1.1 Cílená PCR mutageneze

Pro zavedení cílené mutace, do dvou částečně se překrývajících PCR produktů, byly v prvním kroku využity dva komplementární mutagenizační primery. Dané PCR produkty byly vždy označeny jako fragmenty A a B. Jako templát pro cílené mutace v genu pro proRtxA byl použit plazmid pT7CT7-*rtxC-rtxA*-dH a pro cílené mutace v ACP byl použit plazmid pUT18C-*acp*. Roztoky pro PCR obsahovaly:

- 0,5 µl templátu (0,05 µg DNA)
- 10 µl roztoku 5xQ5 HF Reaction Buffer
- 31 µl sterilní vody
- 5 µl 2 mM dNTP mixu
- 1,5 µl 10 µM přímého primeru
- 1,5 µl 10 µM reverzního primeru
- 0,5 µl DNA polymerasy Q5 HF

Finální objem všech vzorků činil 50 µl. Primery, které byly použity pro zavedení jednotlivých cílených mutací, a také velikost vzniklých fragmentů v počtu bází (bp) jsou uvedeny v tabulce č. 2, str. 43 a tabulce č. 3, str. 44.

Po provedení elektroforézy a následné izolace připravených fragmentů A a B z gelu (kapitola 4.1.2, str. 45, kapitola 4.1.3, str. 45) bylo přistoupeno k druhé části cílené PCR mutageneze. V tomto případě byly fragmenty A a B využity jako templáty. Roztoky pro PCR obsahovaly:

- 5 µl fragmentu A
- 5 µl fragmentu B
- 10 µl roztoku 5xQ5 HF Reaction Buffer
- 21 µl sterilní vody
- 5 µl 2mM dNTP mixu
- 1,5 µl 10 µM přímého primeru
- 1,5 µl 10 µM reverzního primeru
- 1 µl DNA polymerasy Q5 HF

Objem jednotlivých vzorků činil 50 µl. Výsledný fragment pro každou cílenou mutaci byl označen jako fragment C. Využité primery a velikost vzniklých fragmentů jsou uvedeny v tabulce č. 4, str. 44.

Podmínky pro PCR byly v obou případech nastaveny následovně: DNA byla denaturována při 98 °C po dobu 30 sekund. Následně byl třicetkrát zopakován následující cyklus: denaturační fáze při 98 °C po dobu 10 sekund, hybridizační fáze při 56 až 60 °C po dobu 30 sekund a polymerační fáze při 72 °C po dobu 40 až 60 sekund. Na základě délky jednotlivých primerů a vznikajících fragmentů byly upraveny teploty a časy jednotlivých fází cyklu. Na závěr byla přidána polymerační fáze při 72 °C po dobu 10 min.

Tabulka č. 2: Využité primery pro vnesení jednotlivých mutací do genu pro ACP (1. krok)

Mutace v ACP			
Mutace – fragment	Přímý primer	Reverzní primer	Velikost PCR fragmentu (bp)
D36A – fragment A	T18-ACP-For	D36ARev	436
D36A – fragment B	D36AFor	T18-ACP-Rev	483
D39A – fragment A	T18-ACP-For	D39ARev	443
D39A – fragment B	D39AFor	T18-ACP-Rev	466
E48A – fragment A	T18-ACP-For	E48ARev	473
E48A – fragment B	E48AFor	T18-ACP-Rev	436
E49A – fragment A	T18-ACP-For	E49ARev	477
E49A – fragment B	E49AFor	T18-ACP-Rev	434
D57A – fragment A	T18-ACP-For	D57ARev	498
D57A – fragment B	D57AFor	T18-ACP-Rev	411
E61A – fragment A	T18-ACP-For	E61ARev	511
E61A – fragment B	E61AFor	T18-ACP-Rev	399

Tabulka č. 3: Využité primery pro vnesení jednotlivých mutací do genu *rtxA* (1. krok)

Mutace v okolí 2. konzervovaného Lys689 v RtxA			
Mutace - fragment	Přímý primer	Reverzní primer	Velikost PCR fragmentu (bp)
R690L – fragment A	Nhelinfor	R690LRev	875
R690L – fragment B	R690LFor	BlpIRev	908
E692L – fragment A	Nhelinfor	E692LRev	871
E692L – fragment B	E692LFor	BlpIRev	913
Y696L – fragment A	Nhelinfor	Y690LRev	878
Y696L – fragment B	Y696LFor	BlpIRev	904
R697L – fragment A	Nhelinfor	R697LRev	884
R697L – fragment B	R697LFor	BlpIRev	902

Tabulka č. 4: Využité primery pro vnesení jednotlivých mutací do genů *acp* a *rtxA* (2. krok)

Mutace v ACP			
Mutace - fragment	Přímý primer	Reverzní primer	Velikost PCR fragmentu (bp)
D36A – fragment C	T18-ACP-For	T18-ACP-Rev	889
D39A – fragment C	T18-ACP-For	T18-ACP-Rev	889
E48A – fragment C	T18-ACP-For	T18-ACP-Rev	889
E49A – fragment C	T18-ACP-For	T18-ACP-Rev	889
D57A – fragment C	T18-ACP-For	T18-ACP-Rev	889
E61A – fragment C	T18-ACP-For	T18-ACP-Rev	889
Mutace v okolí 2. konzervovaného Lys689 v RtxA			
Mutace - fragment	Přímý primer	Reverzní primer	Velikost PCR fragmentu (bp)
R690L – fragment C	Nhelinfor	BlpIRev	1761
E692L – fragment C	Nhelinfor	BlpIRev	1761
Y696L – fragment C	Nhelinfor	BlpIRev	1761
R697L – fragment C	Nhelinfor	BlpIRev	1761

4.1.2 Elektroforéza v agarosovém gelu

Agarosový gel byl připraven smícháním agarosy v pufrujícím roztoku TBE s výslednou koncentrací 0,8 až 2 % s přídavkem ethidium bromidu s výslednou koncentrací 0,5 µg/ml. Jednotlivé vzorky fragmentů s objemem 50 µl byly smíchány s 10 µl 5xkoncentrovaného barvicího roztoku BFB, který zvýrazní migraci DNA fragmentů na gelu. Pro vyhodnocení správné velikosti daných PCR fragmentů byla použita λ DNA štěpená restriční endonukleasou PstI. Elektroforéza byla provedena při konstantním napětí 100 V po dobu 40 minut v pufrujícím roztoku TBE. Následně byly za pomoci UV transluminátoru vizualizovány fragmenty DNA s interkalovaným ethidium bromidem.

4.1.3 Izolace PCR fragmentů z gelu

Po vizualizaci na gelu byly fragmenty DNA vyříznuty a jejich izolace z gelu byla provedena pomocí sady Monarch DNA Gel Extraction Kit. Ke každému vzorku byl přidán 1 ml rozpouštěcího pufru a poté byly vzorky inkubovány na třepačce při 50 °C po dobu 20 minut. Poté byly vzorky ochlazeny na pokojovou teplotu a přeneseny na kolonu s fritou umístěnou ve sběrné zkumavce. Centrifugace byla provedena při 16 000 g, 1 minutu. Roztok proteklý kolonou byl odstraněn a na kolonu bylo nanášeno 200 µl promývacího pufru. Následovala opětovná centrifugace při 16 000 g, 1 minutu. Promývání vzorků proběhlo dvakrát. Poté byly kolonky s fritou přeneseny do nové sterilní mikrozkuhavky. Na kolonu bylo přidáno 30 µl elučního pufru pro vymytí navázaných fragmentů DNA z frity. Použitý eluční pufr měl teplotu 50 °C. Po přidání přehřátého elučního pufru se vzorky nechaly 2 minuty inkubovat při pokojové teplotě. Následovala další centrifugace při 16 000 g po dobu 1 minuty. Eluční vzorky obsahující izolované fragmenty byly přeneseny do sterilních mikrozkuhovek a ochlazeny.

4.1.4 Štěpení PCR fragmentů

Všechny připravené PCR fragmenty C bylo nutné před vnesením do vhodně štěpeného plazmidu štěpit pomocí restričních endonukleas. Směs pro štěpení byla připravena ve sterilní mikrozkuhavce a obsahovala 10 µl izolovaného PCR fragmentu C, 4 µl CutSmart pufru, 24 µl sterilní vody a 2x 1 µl vhodné restriční endonukleasy

(kapitola 3.2.8, str. 40). Celkový objem připravených vzorků činil 40 μ l. Reakce probíhala 1 hodinu ve vodní lázni při 37 °C. Následovala elektroforéza štěpených fragmentů v agarosovém gelu (kapitola 4.1.2, str. 45) a jejich izolace z gelu pomocí soupravy Monarch DNA Gel Extraction Kit (kapitola 4.1.3, str. 45).

4.1.5 Štěpení a defosforylace plazmidů

Štěpené PCR fragmenty s vnesenou mutací v *rtxA* genu byly vkládány do vhodně štěpeného plazmidu pT7CT7-*rtxC-rtxA*-dH, v případě mutací v *acp* genu pak do vhodně štěpeného plazmidu pUT18C-*acp*. Štěpení každého z plazmidů bylo provedeno v roztoku, který byl připraven z 5 μ l daného plazmidu (0,5 μ g DNA), 2 μ l CutSmart pufru, 12 μ l sterilní vody a 2x 0,5 μ l vhodné restrikční endonukleasy (kapitola 3.2.8, str. 40). Celkový objem připravených vzorků byl 20 μ l. Reakce probíhala 1 hodinu ve vodní lázni při 37 °C. Po rozštěpení plazmidu byly jeho konce defosforylovány. Zabránilo se tak opětovnému uzavření štěpného plazmidu bez vloženého PCR fragmentu. Defosforylace byla provedena přidáním 1 μ l QuickCIP fosfatasy. Po přidání enzymu byl vzorek inkubován ve vodní lázni při 37 °C po dobu 10 minut. Následně byla provedena elektroforéza v agarosovém gelu (kapitola 4.1.2, str. 45) a pomocí soupravy Monarch DNA Gel Extraction Kit (kapitola 4.1.3, str. 45) byl izolován linearizovaný plazmid o správné velikosti.

4.1.6 Ligace štěpeného fragmentu se štěpeným plazmidem

Spojení (ligace) štěpeného PCR fragmentu a štěpeného defosforylovaného plazmidu bylo provedeno v ligační směsi s výsledným objemem 30 μ l. Ligační směs obsahovala 15 μ l ligačního pufru (Quick ligation buffer), 2 μ l připraveného štěpeného a defosforylovaného plazmidu, 8 μ l štěpeného PCR fragmentu, 3,5 μ l sterilní vody, 1,5 μ l DNA ligasy (Quick ligase). Ligace probíhala 10 minut při pokojové teplotě. Pro potvrzení správné účinnosti byla provedena negativní kontrola, při které se místo 8 μ l PCR fragmentu přidalo stejné množství sterilní destilované vody.

4.1.7 Transformace buněk *E. coli* XL-1 Blue

Transformace buněk byla provedena přidáním 15 μ l ligační směsi ke 150 μ l kompetentních buněk *E. coli* XL-1 Blue. Nejprve byla tato směs inkubovaná na ledu po dobu 10 min. Následně byl proveden tepelný šok, a to inkubací vzorků při 37 °C ve vodní lázni po dobu 5 minut a opakovaná inkubace na ledu po dobu 5 minut. Poté byl ke vzorkům přidán 1 ml LB média a vzorky byly inkubovány při 37 °C na vodní lázni po dobu 90 minut. 100 μ l suspenze bylo následně rozetřeno na plotny s LB agarovým médiem obsahujícím ampicilin s výslednou koncentrací 150 μ g/ml. Zbytek bakteriální suspenze byl centrifugován 1 minutu při 16 000 g. Supernatant byl částečně odstraněn a ponechaný objem činil přibližně 100 μ l. Peleta byla v tomto objemu resuspendována a celý její obsah byl rozetřen na další plotny s LB agarovým médiem obsahujícím ampicilin s koncentrací 150 μ g/ml. Takto připravené plotny, s nižším i vyšším předpokládaným množstvím transformovaných buněk, byly inkubovány v reverzní poloze při 37 °C přes noc.

4.1.8 Minipreparace plazmidové DNA

Minipreparace plazmidové DNA byla provedena pomocí sady High-Speed Plasmid Mini Kit, Geneaid. 2 ml tekutého LB média s výslednou koncentrací ampicilinu 150 μ g/ml byly inkubovány jednou kolonií transformovaných buněk. Takto připravené vzorky byly inkubovány přes noc na třepačce při 37 °C. Následující den byly vzorky centrifugovány při 16 000 g po dobu 1 minuty. Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována ve 200 μ l PD1 pufru pomocí vortexu. Následně bylo přidáno 200 μ l PD2 pufru a vzorky byly inverzně promíchány. Poté bylo přidáno 300 μ l PD3 pufru, vzorky byly opět inverzně promíchány a centrifugovány při 16 000 g 3 minuty. Supernatant byl následně nanesen na PD kolonky a centrifugován při 16 000 g po dobu 30 sekund. Poté proběhlo promytí 400 μ l W1 pufrem a 600 μ l promývacím pufrem. Pokaždé byly vzorky centrifugovány při 16 000 g po dobu 30 sekund. Pro odstranění promývacího pufru byly kolonky s nanesenými vzorky centrifugovány při 16 000 g 3 minuty. Následovalo přenesení kolonky do nové sterilní zkumavky. Pak bylo na kolonky nanášeno 50 μ l elučního pufru a vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě 2 minuty. Následně byly

vzorky centrifugovány při 16 000 g po dobu 2 minut. Získané eluáty obsahující plasmidovou DNA byly převedeny do čistých sterilních zkumavek a uchovány při -20 °C.

4.1.9 Ověření plasmidové DNA restrikčními endonukleasami

Pro ověření zavedených tichých mutací a klonovacích míst byla plasmidová DNA po minipreparaci štěpena příslušnými restrikčními endonukleasami. Tiché mutace byly zavedeny v okolí cílené mutace během PCR mutagenese, za účelem tvorby nových restrikčních míst, pro usnadnění ověření zavedené mutace pomocí unikátní restrikční endonukleasy. Zvolené restrikční endonukleasy (kapitola 3.2.8, str. 40) byly vybrány na základě tvorby vhodně dlouhých DNA fragmentů po štěpení plasmidové DNA nesoucí příslušnou mutaci. Tyto fragmenty jsou po vizualizaci na agarosovém gelu po provedení elektroforézy dostatečně separované. K 5 µl vzorku plasmidové DNA bylo přidáno 15 µl štěpící směsi, která obsahovala 2 µl CutSmart pufru, 12 µl sterilní vody a 2x 0,5 µl příslušných restrikčních endonukleas. Následovala inkubace ve vodní lázni při 37 °C po dobu 1 hodiny. Pro potvrzení správné velikosti štěpených DNA fragmentů byla provedena elektroforéza v agarosovém gelu (kapitola 4.1.2, str. 45).

4.1.10 Sekvence připravených konstruktů

Po provedení analýzy byla plasmidová DNA nesoucí příslušnou mutaci ověřena sekvenací provedenou společností Eurofins Genomic, Ebersberg, Německo. Byla tak potvrzena přítomnost požadovaných záměn a vyloučena přítomnost jiných nevhodných mutací.

4.2 Vložení mutovaných DNA fragmentů do plasmidů dvouhybridního systému

Pro vložení DNA fragmentů nesoucích příslušnou mutaci do vektorů, které jsou součástí BACTH systému byla nejprve provedena PCR amplifikace. Ta proběhla za stejných podmínek jako v kapitole 4.1.1, str. 42. Jako templát byly použity fragmenty připravené v kapitole 4.1.1, str. 42. a pro každý vzorek byly využity vhodné primery (tabulka č. 5, str. 50 a tabulka č. 6, str. 51). Následně byla provedena elektroforéza v agarosovém gelu

(kapitola 4.1.2, str. 45) a izolace PCR fragmentů z gelu (kapitola 4.1.3, str. 45). Poté byly fragmenty i vektory štěpeny (kapitola 4.1.4, str. 45 a kapitola 4.1.5, str. 46) pomocí vhodných restričních endonukleas (kapitola 3.2.8, str. 40), vektory také defosforylovány (kapitola 4.1.5, str. 46), a následovala opětovná elektroforéza v agarosovém gelu a izolace příslušných fragmentů a vektorů z gelu. Poté proběhla ligace štěpených PCR fragmentů se štěpenými vektory (kapitola 4.1.6, str. 46) a transformace takto připravených plazmidů do buněk (kapitola 4.1.7, str. 47). Z vybraných transformant byla provedena minipreparace plazmidové DNA (kapitola 4.1.8, str. 47), která byla ověřena (kapitola 4.1.9, str. 48) štěpením pomocí vhodných restričních endonukleas (kapitola 3.2.8, str. 40). Pro potvrzení inserce správného fragmentu byly připravené plazmidové konstrukty sekvenovány (kapitola 4.1.10, str. 48).

Tabulka č. 5: Templáty a primery použité pro PCR amplifikaci DNA fragmentů s cílenými mutacemi, které byly vkládány do vektorů BACTH systému.

RtxA₅₂₉₋₇₁₈-T18			
Použitý templát	Přímý primer	Reverzní primer	Počet bází
pT7CT7- <i>rtxC-rtxA</i> -dH	SphI-rtxA529-For	SacI-rtxA718-Rev	593
T18-RtxA₅₂₉₋₇₁₈			
Použitý templát	Přímý primer	Reverzní primer	Počet bází
pT7CT7- <i>rtxC-rtxA</i> -dH	BamHI-rtxA529-For	KpnI-rtxA718-Rev	593
RtxC-T25			
Použitý templát	Přímý primer	Reverzní primer	Počet bází
pT7CT7- <i>rtxC-rtxA</i> -dH	HindIII-rtxC-For	SacI-rtxC-Rev	524
T25-RtxC			
Použitý templát	Přímý primer	Reverzní primer	Počet bází
pT7CT7- <i>rtxC-rtxA</i> -dH	BamHI-rtxC-For	KpnI-rtxC-Rev	524
ACP-T18			
Použitý templát	Přímý primer	Reverzní primer	Počet bází
<i>E. coli</i> XL-1 Blue gDNA	HindIII-acp-For	SacI-acp-Rev	257
T18-ACP			
Použitý templát	Přímý primer	Reverzní primer	Počet bází
<i>E. coli</i> XL-1 Blue gDNA	BamHI-acp-For	KpnI-acp-Rev	257
T18-RtxA₅₂₉₋₆₂₃			
Použitý templát	Přímý primer	Reverzní primer	Počet bází
pT7CT7- <i>rtxC-rtxA</i> -dH	BamHI-rtxA529-For	KpnI-rtxA623-Rev	308
T18-RtxA₆₂₄₋₇₁₈			
Použitý templát	Přímý primer	Reverzní primer	Počet bází
pT7CT7- <i>rtxC-rtxA</i> -dH	BamHI-rtxA624-For	KpnI-rtxA718-Rev	308

Tabulka č. 6: Templáty a primery použité pro PCR amplifikaci DNA fragmentů s cílenými mutacemi, které byly vkládány do vektorů BACTH systému.

Mutace konzervovaných lysinových zbytků v RtxA				
Mutace	Požítý templát	Přímý primer	Reverzní primer	bp
K558R	pT7CT7- <i>rtxC-rtxA</i> -K558R-TEV-dH	BamHI- <i>rtxA529-For</i>	KpnI- <i>rtxA718-Rev</i>	593
K558Q	pT7CT7- <i>rtxC-rtxA</i> -K558Q-TEV-dH	BamHI- <i>rtxA529-For</i>	KpnI- <i>rtxA718-Rev</i>	593
K689R	pT7CT7- <i>rtxC-rtxA</i> -K689R-TEV-dH	BamHI- <i>rtxA529-For</i>	KpnI- <i>rtxA718-Rev</i>	593
K689Q	pT7CT7- <i>rtxC-rtxA</i> -K689Q-TEV-dH	BamHI- <i>rtxA529-For</i>	KpnI- <i>rtxA718-Rev</i>	593
K558R+K689R	pT7CT7- <i>rtxC-rtxA</i> -K558R+K689R-TEV-dH	BamHI- <i>rtxA529-For</i>	KpnI- <i>rtxA718-Rev</i>	593
K558Q+K689Q	pT7CT7- <i>rtxC-rtxA</i> -K558Q+K689Q-TEV-dH	BamHI- <i>rtxA529-For</i>	KpnI- <i>rtxA718-Rev</i>	593
Mutace konzervovaných lysinových zbytků na zkrácených fragmentech RtxA				
Mutace	Požítý templát	Přímý primer	Reverzní primer	bp
K558R	pT7CT7- <i>rtxC-rtxA</i> -K558R-TEV-dH	BamHI- <i>rtxA529-For</i>	KpnI- <i>rtxA623-Rev</i>	308
K558Q	pT7CT7- <i>rtxC-rtxA</i> -K558Q-TEV-dH	BamHI- <i>rtxA529-For</i>	KpnI- <i>rtxA623-Rev</i>	308
K689R	pT7CT7- <i>rtxC-rtxA</i> -K689R-TEV-dH	BamHI- <i>rtxA624-For</i>	KpnI- <i>rtxA718-Rev</i>	308
K689Q	pT7CT7- <i>rtxC-rtxA</i> -K689Q-TEV-dH	BamHI- <i>rtxA624-For</i>	KpnI- <i>rtxA718-Rev</i>	308
Mutace v okolí 2. konzervovaného Lys689 v RtxA				
Mutace	Použitý templát	Přímý primer	Reverzní primer	bp
R690L	pT7CT7- <i>rtxC-rtxA</i> -R690L-TEV-dH	BamHI- <i>rtxA624-For</i>	KpnI- <i>rtxA718-Rev</i>	308
E692L	pT7CT7- <i>rtxC-rtxA</i> -E692L-TEV-dH	BamHI- <i>rtxA624-For</i>	KpnI- <i>rtxA718-Rev</i>	308
Y696L	pT7CT7- <i>rtxC-rtxA</i> -Y696L-TEV-dH	BamHI- <i>rtxA624-For</i>	KpnI- <i>rtxA718-Rev</i>	308
R697L	pT7CT7- <i>rtxC-rtxA</i> -R697L-TEV-dH	BamHI- <i>rtxA624-For</i>	KpnI- <i>rtxA718-Rev</i>	308

4.3 Pěstování bakterií na MacConkey agaru

Bakterie *E. coli cya⁻* nejsou schopny fermentovat laktosu nebo maltosu: tvoří bílé (nebo světle růžové) kolonie na MacConkey indikátorovém médiu obsahujícím laktosu nebo maltosu, zatímco bakterie *cya⁺* tvoří na stejném médiu červené kolonie. Fermentace přidaných cukrů má za následek pokles pH média, který se projevuje změnou barvy u barviva neutrální červeně. Ta se v médiu využívá se jako pH indikátor, který funguje stejně jako lakmusový papírek. Při poklesu pH pod 6,8 se zabarví do červena/růžova. K danému médiu se přidávají disacharidy, jako jsou laktosa nebo maltosa. Tyto sacharidy slouží jako zdroj uhlíků pro bakterie, které ho jsou schopny metabolizovat. Fermentací následně vznikají organické kyseliny. Když se kyseliny uvolňují do okolního média, pH média klesá. Růžová barva média je indikátorem, že bakterie pěstované v daném médiu mají *cya⁺* charakter. Bakterie *cya⁻* naopak mění pH média na zásadité v důsledku deaminace aminokyselin. Zvýšení pH média může vést ke změně barvy média na žlutou, protože neutrální červená se při alkalickém pH mění na žlutou.

Nejvhodnějším sacharidem pro práci se základním médiem MacConkey agar je maltosa. 40 g agaru MacConkey bylo rozpuštěno v 1 litru destilované vody a sterilizováno v autoklávu. Zásobní roztok maltosy bez glukosy (20 % v destilované vodě) se sterilizuje filtrací. Maltosa o výsledné koncentraci 1 % a také antibiotika (ampicilin 100 µg/ml a kanamycin 50 µg/ml) se přidávají do vyklávaného MacConkey agaru těsně před nalitím na plotny. IPTG (isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid) o výsledné koncentraci 0,5 mM může být zahrnut do média pro indukci plné exprese genů kódujících hybridní proteiny, která se spouští z regulačních oblastí *lac* operonu.

Dva rekombinantní plazmidy kódující hybridní proteiny T25-X (nebo X-T25) a T18-Y (nebo Y-T18) byly kotransformovány do kompetentních reportérových buněk BTH101. Vysoká úroveň kompetence buněk *E. coli* umožňuje kotransformaci dvou plazmidů. K 20 µl buněk BTH101 bylo přidáno 100 ng rekombinantních plazmidů a vzorky byly inkubovány na ledu 10 minut. Následovala inkubace ve vodní lázni po dobu 5 minut při 37 °C a pak opětovná inkubace na ledu 5 minut. Ke vzorkům byl přidán 1 ml LB média a vzorky byly inkubovány 2 hodiny ve vodní lázni při 37 °C. Po inkubaci bylo 10 µl vzorku smícháno s 90 µl LB média a výsledných 100 µl bylo naneseno na plotny s MacConkey agarem. Plotny byly inkubovány při 30 °C tři až čtyři dny.

4.4 Měření enzymové aktivity β -galaktosidasy

Nejprve byla připravena noční bakteriální kultura. 2,5 ml LB média s 0,5 mM IPTG a příslušnými antibiotiky (ampicilin 100 ug/ml a kanamycin 50 ug/ml) bylo inokulováno v průměru 3 koloniemi bakterií pěstovaných na MacConkey agaru po 3 dny. Takto připravené vzorky byly kultivovány při 30 °C přes noc. Následující den bylo odebráno 500 μ l noční kultury, která byla zředěna v poměru 1:4 LB médiem a OD výsledné bakteriální suspenze byla změřena při 600 nm. Z noční bakteriální kultury bylo pak odebráno dalších 500 μ l a zředěno v poměru 1:4 M63 médiem. Ke vzorkům bylo přidáno 30 μ l toluenu a 30 μ l 0,1 % SDS pro rozbití buněk. Takto připravené vzorky byly inkubovány na třepačce při 37 °C 45 minut. Pro měření enzymové reakce bylo následně odebráno 300 μ l z daných vzorků a přidáno 700 μ l PM2 pufru. K danému médiu bylo nutné přidat, těsně před ředěním, β -merkptoethanol do výsledné koncentrace 100mM. Všechny vzorky byly následně inkubovány ve vodní lázni při 28 °C po dobu 5 minut a poté spuštěna enzymová reakce přidavkem 250 μ l umělého substrátu ONPG o koncentraci 4 mg/ml, který byl rozpuštěn v PM2 pufru. Vzorky, u kterých byla přítomna β -galaktosidasa začaly žloutnout. Reakce byla po 1 minutě zastavena přidáním 500 μ l 1M Na₂CO₃ s pH 11,0, při kterém je β -galaktosidasa neaktivní. Následně byla změřena OD vzorků při 420 nm a enzymová aktivita β -galaktosidasy byla vypočtena podle následující rovnice

$$A = 200 \cdot (OD_{420}/\text{čas}) \cdot \text{faktor ředění} \quad (1)$$

kde písmeno A vyjadřuje enzymovou aktivitu, faktor 200 je převrácená hodnota absorpčního koeficientu o-nitrofenolu, tj. 0,005 na 1 nmol/ml při pH 11,0. Čas byl zadán v minutách a vyjadřuje délku trvání enzymové reakce od jejího spuštění po její zastavení. Faktor ředění vyjadřuje poměr lyzované kultury buněk s PM2 puftrem. Takto vypočtená enzymová aktivita β -galaktosidasy se udává v units/ml. Výsledky jsou následně přepočteny na množství suché hmotnosti bakterií a uváděny v units/mg. Daný údaj se stanoví z měření OD noční kultury bakterií při 600 nm. Bere se v úvahu, že pokud 1 ml kultury se při měření OD₆₀₀ rovná 1, odpovídá to 300 μ g suché hmoty bakterií. Daná rovnice byla uvedena v protokolu BACTH systému od firmy Euromedex.

5 Výsledky

Ke studiu interakcí mezi acyltransferasou RtxC a proteiny ACP a proRtxA pomocí BACTH systému bylo nejprve nezbytné připravit řadu plazmidových konstruktů, které jsou popsány níže.

Jako první byl připraven plazmid nesoucí gen *acp*, který kóduje protein ACP. K tomuto účelu byl gen *acp* amplifikován pomocí PCR, kdy jako templátová DNA byla použita chromozomální DNA bakterie *E. coli* XL-1 Blue. Daný gen byl vnesen do MCS plazmidu pUT18C, přičemž vznikl nový plazmid pUT18C-*acp*. Následně byly pomocí cílené PCR mutagenese zavedeny do genu *acp* mutace, které vedly k zavedení bodových substitucí D36A, D39A, E48A, E49A, D57A a E61A do proteinu ACP.

Pro přípravu mutací v genu *rtxA* byl využit plazmid pT7CT7-*rtxC-rtxA*-dH. Mutace v genu *rtxA* byly připraveny pomocí cílené PCR mutagenese. Daný gen kóduje protoxin proRtxA a pomocí mutagenese v něm byly připraveny následující substituce: R690L, E692L, Y696L a R697L. V práci byly také využity již dříve připravené plazmidy, založené na plazmidu pT7CT7-*rtxC-rtxA*-TEV-dH,³⁹ z nichž jsou exprimovány mutantní varianty RtxA, s následujícími substitucemi: K558R, K558Q, K689R, K689Q, K558R+K689R a K558Q+K689Q. Jedná se o substituce dvou konzervovaných lysinových zbytků (K558 a K689), které jsou v intaktním proRtxA acylovány pomocí acyltransferasy RtxC za využití acyl-ACP jako donoru acylového řetězce.

Substituované aminokyselinové zbytky v ACP byly zvoleny na základě *in silico* interakčního modelu mezi RtxC a ACP, který byl sestaven z modelů struktur RtxC a ACP získaných pomocí programu AlphaFold2 (Dr. J. Černý, BTÚ AV ČR). K substituci byly vybrány negativně nabitě zbytky ACP, které by mohly interagovat s pozitivně nabitými zbytky acyltransferasy RtxC. Substituce zbytků K558 a K689 v proRtxA byly zvoleny za základě *in silico* predikcí a předchozí publikované práce.³⁹ Předpokládá se, že by mohly být podstatné pro interakci proRtxA s RtxC.

Následně byly gen *acp*, různě dlouhé segmenty genu *rtxA* a jejich mutantní varianty zavedeny do plazmidů pUT18C a pUT18, které nesou rezistenci vůči ampicilinu. Gen *rtxC* byl zaveden do plazmidů pKT25 a pKNT25, které nesou rezistenci vůči kanamycinu. Pro jejich zavedení do plazmidů bylo využito MCS tak, že byly příslušné geny fúzovány s DNA sekvencí kódující T18, resp. T25 fragment AC enzymu. Z daných

plazmidů tak byly exprimovány protein ACP, části proteinu proRtxA a jejich mutantní varianty fúzované k N- nebo C-konci fragmentu T18 a protein RtxC fúzovaný k N- nebo C-konci fragmentu T25.

Zkonstruované plazmidy byly následně kotransformovány do buněk *E. coli* BTH101, které byly pěstovány na MacConkey agaru s přidavkem 1% maltosy, 0,5 mM IPTG a příslušných antibiotik (ampicilin 100 µg/ml a kanamycin 50 µg/ml). Plotny byly inkubovány 3 dny při 30 °C. Kolonie buněk, u kterých dochází k pozitivní interakci mezi produkovanými fúzními proteiny byly na MacConkey agaru zbarveny červeně. Pokud k interakci mezi fúzními proteiny nedošlo, kolonie buněk byly zbarveny bíle (obrázek č. 10).

Pomocí BACTH systému byly studovány interakce RtxC s ACP a jeho mutantními variantami a také interakce RtxC s proRtxA a jeho mutantními variantami. Vždy byla stanovena enzymová aktivita β-galaktosidasy, která je přímo úměrná síle interakce mezi danými fúzními proteiny.



Obrázek č. 10: Ukázka negativní a pozitivní interakce mezi hybridními proteiny v buňkách *E. coli* BTH101 na plotnách s MacConkey agarem, který je bez přítomnosti buněk růžový. Na plotně vlevo jsou buňky, do kterých byly kotransformovány kontrolní plazmidy pKNT25 a pUT18, z nichž jsou produkovány pouze samostatné fragmenty T25 a T18, které nejsou schopny rekonstituovat funkční AC enzym a dané buňky tak vykazují *cya⁻* charakter. Vpravo jsou na plotně buňky, do kterých byly kotransformovány kontrolní plazmidy pKT25-*zip* a pUT18C-*zip* z nichž jsou produkovány fragmenty T25 a T18 fúzované k leucinovému zipu. Díky interakci mezi segmenty leucinového zipu dochází k interakci fragmentů T25 a T18, čímž se vytvoří funkční AC enzym a buňky vykazují *cya⁺* charakter.

Při každém měření enzymové aktivity β-galaktosidasy byla měřena také pozitivní a negativní kontrola. Pro pozitivní kontrolu byly využity plazmidy pKT25-*zip* a pUT18C-*zip*, z nichž byly produkovány fragmenty T25 a T18 fúzované s leucinovým zipem. Pro negativní kontrolu byly využity plazmidy pKT25/pKNT25 s pUT18C/pU18, z nichž byly produkovány pouze samostatné fragmenty T25 a T18 bez fúzních partnerů. Kombinace použitých plazmidů jsou zobrazeny na obrázku č. 11, str. 56.

T25-LeuZip ... T18-LeuZip	pKT25- zip , KanR + pUT18C- zip , AmpR
T25-MCS ... T18-MCS	pKT25, KanR + pUT18C, AmpR
T25-MCS ... MCS-T18	pKT25, KanR + pUT18, AmpR
MCS-T25 ... T18-MCS	pKNT25, KanR + pUT18C, AmpR
MCS-T25 ... MCS-T18	pKNT25, KanR + pUT18, AmpR

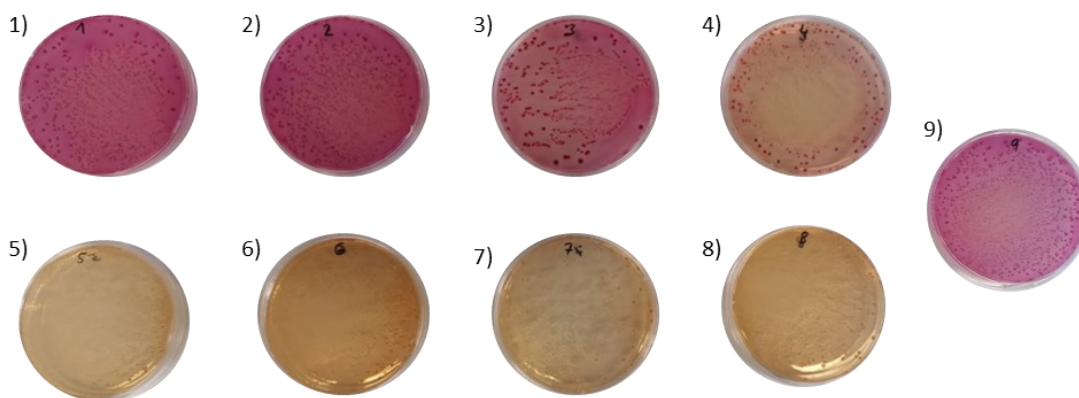
Obrázek č. 11: Kombinace plazmidů používaných pro pozitivní a negativní kontrolu v BACTH systému. Pro pozitivní kontrolu byly využity plazmidy pKT25-**zip** a pUT18C-**zip**, z nichž byly produkovány fragmenty T25 a T18 fúzované s leucinovým zipem. Pro negativní kontroly byly využity plazmidy pKT25/pKNT25 s pUT18C/pU18, z nichž byly produkovány pouze samostatné fragmenty T25 a T18 bez fúzních partnerů.

5.1 Testování interakcí RtxC s ACP

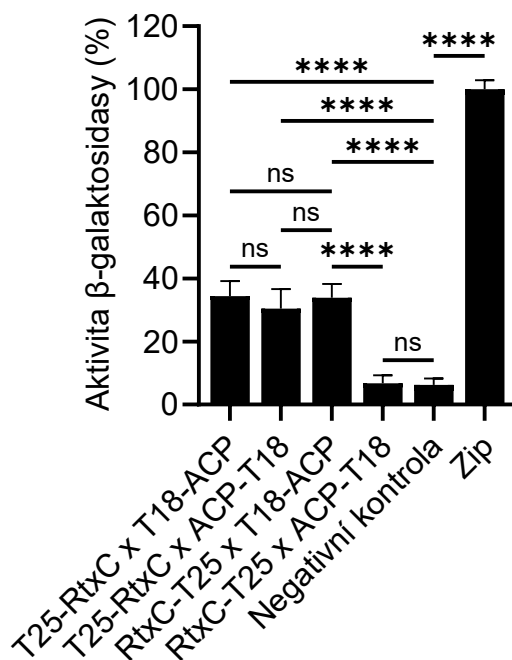
Nejprve bylo testováno, která ze 4 kombinací fúzních proteinů vede k nejsilnější interakci mezi proteiny RtxC a ACP. Byly testovány N- a C-koncové fúze RtxC s T25 a ACP s T18, dle schématu na obrázku č. 12. Po kotransformaci příslušných plazmidů do buněk *E. coli* BTH101, byly buňky pěstovány 3 dny při 30 °C na MacConkey agaru (obrázek č. 13, str. 57). Z ploten bylo následně zaočkováno několik kolonií do tekutého média, bakterie byly kultivovány 14 hodin ve 30 °C a poté byly kultury použity ke stanovení enzymové aktivity β -galaktosidasy, která je úměrná síle interakce mezi jednotlivými interakčními partnery. Výsledky jsou zobrazeny v grafu č. 1, str 57.

1)	T25-RtxC ... T18-ACP	pKT25- rtxC , KanR + pUT18C- acp , AmpR
2)	T25-RtxC ... ACP-T18	pKT25- rtxC , KanR + pU- acp-T18 , AmpR
3)	RtxC-T25 ... T18-ACP	pKN- rtxC-T25 , KanR + pUT18C- acp , AmpR
4)	RtxC-T25 ... ACP-T18	pKN- rtxC-T25 , KanR + pU- acp-T18 , AmpR

Obrázek č. 12: Kombinace fúzních proteinů pro testování interakcí RtxC s ACP. Vlevo jsou příslušné kombinace fúzních proteinů, vpravo pak příslušné plazmidy, z nichž byly tyto fúzní proteiny produkovány. U každého plazmidu je uvedeno antibiotikum, vůči kterému nese daný plazmid rezistenci.



Obrázek č. 13: Plotny s buňkami *E. coli* BTH101 kotransformovanými různými dvojicemi plazmidů. Buňky na plotnách 1-4 obsahují kombinace plazmidů, z nichž jsou produkovány N- nebo C-koncové fúze RtxC s T25 a APC s T18 (pořadí odpovídá číslování na obrázku č. 12). Plotny 5-8 obsahují negativní kontroly a pozitivní kontrola je na plotně č. 9 (viz obrázek č. 11).



Graf č. 1: Aktivity β -galaktosidasy po interakci mezi RtxC a ACP fúzovanými s T25, resp. T18. Výsledná aktivita je přepočtena na procenta, kdy 100 % bylo přiřazeno interakci mezi fúzními proteiny T25-LeuZip a T18-LeuZip. Výsledky jsou zobrazeny jako průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou ze tří nezávislých experimentů provedených v triplicátu. Data byla vyhodnocena pomocí metody ANOVA (****, $p < 0.0001$; ns, nesignifikantní).

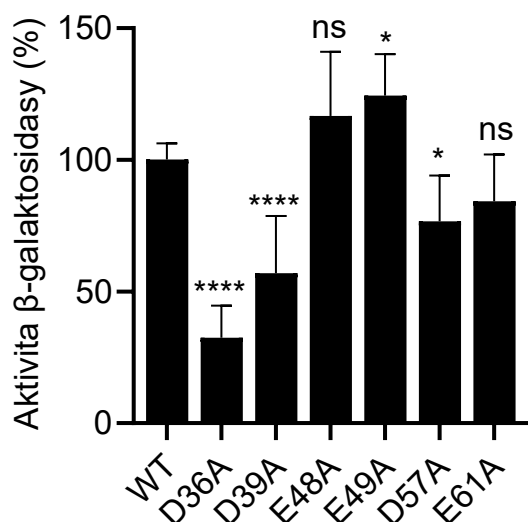
Získaná data ukazují, že nejlépe interagovali tři dvojice fúzních proteinů, a to T25-RtxC s T18-ACP, T25-RtxC s ACP-T18 a RtxC-T25 s T18-ACP. Nicméně poslední dvojice, RtxC-T25 s ACP-T18, interagovala na úrovni negativní kontroly.

5.2 Testování interakcí RtxC s mutantními variantami ACP

Na základě předešlého testování nejsilnější interakce mezi N- nebo C-koncovými fúzními proteiny RtxC s T25 a ACP s T18 byla k dalším experimentům zvolena kombinace RtxC-T25 s T18-ACP. Proto byly v rámci plazmidu pUT18C-*acp*, z něhož je produkován fúzní protein T18-ACP, vneseny do genu *acp* mutace, které vedly k zavedení bodových substitucí D36A, D39A, E48A, E49A, D57A a E61A v proteinové sekvenci ACP. U daných mutantních variant ACP byla testována jejich interakce s RtxC, dle schématu na obrázku č. 14. Plazmidy byly kotransformovány do buněk *E. coli* BTH101 a pěstovány 3 dny při 30 °C na MacConkey agaru. Do tekutého LB média bylo z ploten následně zaočkováno několik kolonií a bakterie byly kultivovány 14 hodin při 30 °C. Tyto kultury byly použity k měření enzymové aktivity β -galaktosidasy, která je úměrná síle interakce mezi jednotlivými interakčními partnery. Výsledky jsou zobrazeny v grafu č. 2, str. 59.

RtxC-T25 ... T18-ACP-D36A	pKN-rtxC-T25, KanR + pUT18C- <i>acp</i> -D36A, AmpR
RtxC-T25 ... T18-ACP-D39A	pKN-rtxC-T25, KanR + pUT18C- <i>acp</i> -D39A, AmpR
RtxC-T25 ... T18-ACP-E48A	pKN-rtxC-T25, KanR + pUT18C- <i>acp</i> -E48A, AmpR
RtxC-T25 ... T18-ACP-E49A	pKN-rtxC-T25, KanR + pUT18C- <i>acp</i> -E49A, AmpR
RtxC-T25 ... T18-ACP-D57A	pKN-rtxC-T25, KanR + pUT18C- <i>acp</i> -D57A, AmpR
RtxC-T25 ... T18-ACP-E61A	pKN-rtxC-T25, KanR + pUT18C- <i>acp</i> -E61A, AmpR

Obrázek č. 14: Kombinace fúzních proteinů pro testování interakcí RtxC s mutantními variantami ACP. Vlevo jsou příslušné kombinace fúzních proteinů, vpravo pak příslušné plazmidy, z nichž byly tyto fúzní proteiny produkovány. U každého plazmidu je uvedeno antibiotikum, vůči kterému nese daný plazmid rezistenci.



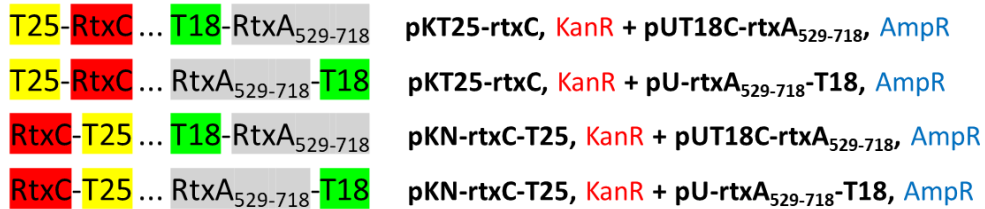
Graf č. 2: Enzymová aktivita β -galaktosidasy po interakci mezi RtxC a mutantními variantami ACP fúzovanými s T25, resp. T18. Výsledná aktivita je přepočtena na procenta, kdy 100 % bylo přiřazeno interakci RtxC-T25 s nemutovaným T18-ACP (WT). Výsledky jsou zobrazeny jako průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou ze tří nezávislých experimentů provedených v triplicátu. Data byla vyhodnocena pomocí metody ANOVA (*, $p < 0.05$; ****, $p < 0.0001$; ns, nesignifikantní).

Získané výsledky ukazují, že interakce mezi RtxC a ACP byla snížena o 67,5 % po zavedení substituce D36A, o 43 % po zavedení substituce D39A a o 23,3 % po zavedení substituce D57A do proteinu ACP. Na druhé straně substituce E48A, E49A a E61A v proteinové sekvenci ACP nevedly k signifikantnímu snížení interakce mezi RtxC a ACP.

5.3 Testování interakcí RtxC s proRtxA

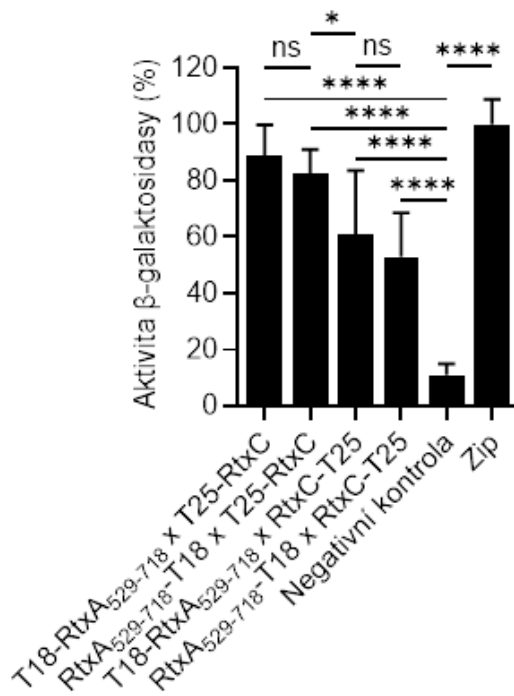
K nalezení nejsilnější interakce mezi proteiny RtxC a proRtxA fúzovanými k fragmentu T25, resp. T18 byly testovány 4 kombinace fúzních proteinů nesoucích N- a C-koncové fúze RtxC s T25 a fragmentu proRtxA s T18, dle schématu na obrázku č. 15, str. 60. Fragment proRtxA nesl aminokyselinové zbytky 529 až 718 (dále bude používána zkratka: RtxA₅₂₉₋₇₁₈), zahrnující oba konzervované lysinové zbytky (K558 a K689), na nichž dochází ke kovalentní modifikaci acylovými řetězci. Plazmidy kódující dané hybridní proteiny byly kotransformovány do buněk *E. coli* BTH101. Buňky byly pěstovány 3 dny při 30 °C na MacConkey agaru a následně bylo několik kolonií zaočkováno do tekutého média a kultivováno 14 hodin při 30 °C. Takto připravené

kultury byly použity ke stanovení enzymové aktivity β galaktosidasy, která je úměrná síle interakce mezi jednotlivými interakčními partnery. Výsledky jsou zobrazeny v grafu č. 3.



Obrázek č. 15: Kombinace fúzních proteinů pro testování interakcí RtxC s RtxA₅₂₉₋₇₁₈. Vlevo se nachází kombinace testovaných fúzních proteinů, vpravo pak příslušné plazmidy, z nichž byly tyto fúzní proteiny produkovány. U každého plazmidu je uvedeno antibiotikum, vůči kterému nese daný plazmid rezistenci.

Získané výsledky ukazují, že nejsilněji interagující dvojice fúzních proteinů jsou T18-RtxA₅₂₉₋₇₁₈ s T25-RtxC a RtxA₅₂₉₋₇₁₈-T18 s T25-RtxC. Nižší hodnoty interakce pak byly naměřeny u dvojice fúzních proteinů T18-RtxA₅₂₉₋₇₁₈ s RtxC-T25 a RtxA₅₂₉₋₇₁₈-T18 s RtxC-T25.



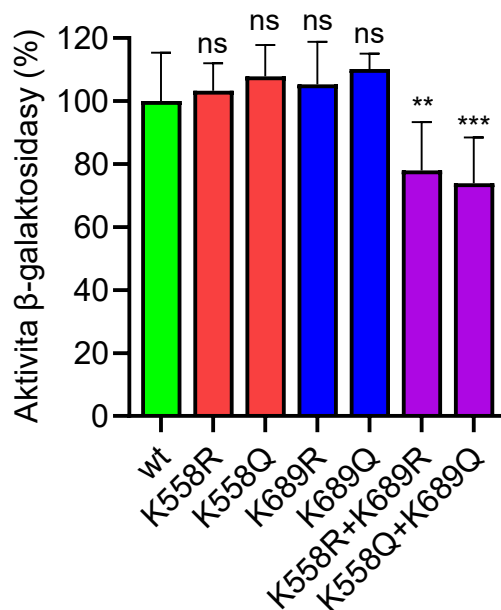
Graf č. 3: Enzymová aktivita β -galaktosidasy po interakci mezi RtxC a RtxA₅₂₉₋₇₁₈ fúzovanými s fragmenty T25, resp. T18. Aktivita je přepočtena na procenta, přičemž 100 % bylo přiřazeno interakci mezi fúzními proteiny T25-LeuZip a T18-LeuZip. Výsledky jsou zobrazeny jako průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou ze tří nezávislých experimentů provedených v triplicátu. Data byla vyhodnocena pomocí metody ANOVA (*, $p < 0.05$; ****, $p < 0.0001$; ns, nesignifikantní).

5.4 Testování interakcí mezi RtxC a RtxA₅₂₉₋₇₁₈ s mutovanými zbytky K558 a K689

Na základě výše uvedených výsledků, založených na testování 4 kombinací fúzních proteinů RtxC s T25 a RtxA₅₂₉₋₇₁₈ s T18, byla k dalším pokusům zvolena kombinace T25-RtxC s T18-RtxA₅₂₉₋₇₁₈. Do genu kódujícího fúzní protein T18-RtxA₅₂₉₋₇₁₈, byly vneseny mutace, které vedly k zavedení substitucí konzervovaných lysinových zbytků v proteinu RtxA₅₂₉₋₇₁₈, a to K558R, K558Q, K689R, K689Q, K558R+K689R a K558Q+K689Q. Interakce získaných mutantních variant s RtxC byla testována dle schématu na obrázku č. 16. Plazmidy byly kotransformovány do buněk *E. coli* BTH101 a poté pěstovány 3 dny při 30 °C na MacConkey agaru. Do tekutého LB média bylo z ploten zaočkováno několik kolonií a bakterie byly kultivovány 14 hodin při 30 °C. Získané kultury byly následně využity na měření enzymové aktivity β-galaktosidasy, která je úměrná síle interakce mezi jednotlivými interakčními partnery. Výsledky jsou zobrazeny v grafu č. 4, str. 62.

T25-RtxC ... T18-RtxA ₅₂₉₋₇₁₈ K558R	pKT25-rtxC, KanR + pUT18C-rtxA529-718-K558R, AmpR
T25-RtxC ... T18-RtxA ₅₂₉₋₇₁₈ K558Q	pKT25-rtxC, KanR + pUT18C-rtxA529-718-K558Q, AmpR
T25-RtxC ... T18-RtxA ₅₂₉₋₇₁₈ K689R	pKT25-rtxC, KanR + pUT18C-rtxA529-718-K689R, AmpR
T25-RtxC ... T18-RtxA ₅₂₉₋₇₁₈ K689Q	pKT25-rtxC, KanR + pUT18C-rtxA529-718-K689Q, AmpR
T25-RtxC ... T18-RtxA ₅₂₉₋₇₁₈ K558R+K689R	pKT25-rtxC, KanR + pUT18C-rtxA529-718-K558R+K689R, AmpR
T25-RtxC ... T18-RtxA ₅₂₉₋₇₁₈ K558Q+K689Q	pKT25-rtxC, KanR + pUT18C-rtxA529-718-K558Q+K689Q, AmpR

Obrázek č. 16: Kombinace fúzních proteinů pro testování interakcí RtxC s mutantními variantami RtxA₅₂₉₋₇₁₈. Vlevo jsou příslušné kombinace fúzních proteinů, vpravo pak příslušné plazmidy, z nichž byly tyto fúzní proteiny produkovány. U každého plazmidu je uvedeno antibiotikum, vůči kterému nese daný plazmid rezistenci.



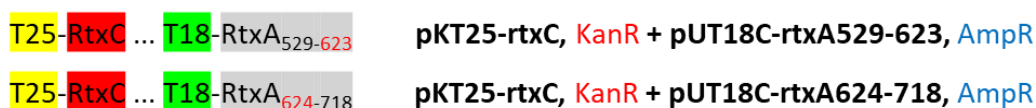
Graf č. 4: Aktivity β-galaktosidasy po interakci mezi RtxC a mutantními variantami RtxA₅₂₉₋₇₁₈, které nesou substituce konzervovaných lysinových zbytků (K558 a K689), fúzanými s fragmenty T25, resp. T18. Výsledná aktivita je přepočtena na procenta, kdy 100 % bylo přiřazeno interakci T25-RtxC s nemutovaným T18-RtxA₅₂₉₋₇₁₈ (WT), znázorněné zelenou barvou. Červenou barvou jsou zvýrazněny mutace v prvním lysinovém zbytku K558, modrou barvou jsou zvýrazněny mutace v druhém lysinovém zbytku K689 a fialovou jsou znázorněny kombinované substituce obou lysinových zbytků. Výsledky jsou zobrazeny jako průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou ze tří nezávislých experimentů provedených v triplicátu. Data byla vyhodnocena pomocí metody ANOVA (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, nesignifikantní).

Získaná data ukazují, že substituce jednotlivých konzervovaných lysinových zbytků (K558 anebo K689) v proteinu RtxA₅₂₉₋₇₁₈ nemají žádný vliv na interakci mezi proteiny RtxC a RtxA₅₂₉₋₇₁₈. K poklesu dané interakce došlo až po vnesení substitucí současně do obou konzervovaných lysinových zbytků v proteinu RtxA₅₂₉₋₇₁₈.

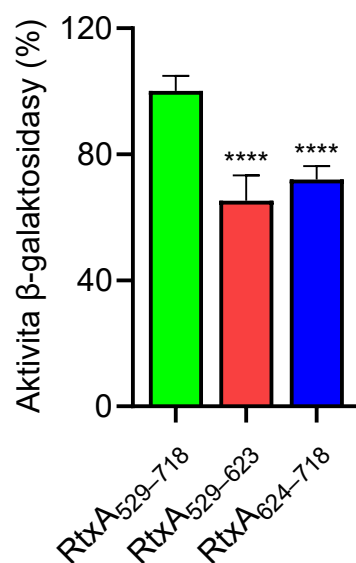
5.5 Testování interakcí RtxC se zkrácenými fragmenty proRtxA

Na základě předešlých výsledků, kdy byla pozorována snížená interakce mezi RtxC a RtxA₅₂₉₋₇₁₈, který nesl substituce obou konzervovaných lysinových zbytků, byly připraveny fúzní proteiny T18 s proRtxA ve dvou zkrácených variantách. První zkrácený fragment proRtxA nesl zbytky 529 až 623 (dále bude používána zkratka: RtxA₅₂₉₋₆₂₃),

druhý zbytky 624 až 718 (dále bude používána zkratka: RtxA₆₂₄₋₇₁₈). Každý zkrácený fragment tak nesl právě jedno acylované místo s jedním z konzervovaných lysinových zbytků (K558 resp. K689). Interakce takto zkrácených fragmentů proRtxA s acyltransferasou RtxC byla testována dle schématu na obrázku č. 17. Příslušné plazmidy kódující dané fúzní proteiny byly kotransformovány do buněk *E. coli* BTH10 a následně pěstovány 3 dny při 30 °C na MacConkey agaru. Z ploten bylo několik kolonií zaočkováno do tekutého LB média a bakterie byly kultivovány 14 hodin při 30 °C. Takto připravené kultury byly použity ke stanovení β-galaktosidasové aktivity, která je úměrná síle interakce mezi jednotlivými interakčními partnery. Výsledky jsou zobrazeny v grafu č. 5.



Obrázek č. 17: Kombinace fúzních proteinů pro testování interakcí RtxC s fragmenty RtxA₅₂₉₋₆₂₃ a RtxA₆₂₄₋₇₁₈. Vlevo jsou příslušné kombinace fúzních proteinů, vpravo pak příslušné plazmidy, z nichž byly tyto fúzní proteiny produkovány. U každého plazmidu je uvedeno antibiotikum, vůči kterému nese daný plazmid rezistenci.



Graf č. 5: Aktivita β-galaktosidasy po interakci mezi RtxC a zkrácenými fragmenty RtxA₅₂₉₋₆₂₃ a RtxA₆₂₄₋₇₁₈ fúzovanými s fragmenty T25, resp. T18. Výsledná aktivita je přepočtena na procenta, kdy 100 % bylo přiřazeno interakci mezi T25-RtxC a T18-RtxA₅₂₉₋₇₁₈, znázorněna zelenou barvou. Interakce RtxC se zkráceným fragmentem RtxA₅₂₉₋₆₂₃, který obsahuje první konzervovaný lysinový zbytek K558 je znázorněna červenou barvou. Interakce RtxC se zkráceným fragmentem RtxA₆₂₄₋₇₁₈, který obsahuje druhý konzervovaný lysinový zbytek K689 je znázorněna modrou barvou. Výsledky jsou zobrazeny jako průměry se směrodatnou odchylkou ze tří nezávislých experimentů provedených v triplikátu. Data byla vyhodnocena pomocí metody ANOVA (****, $p < 0.0001$).

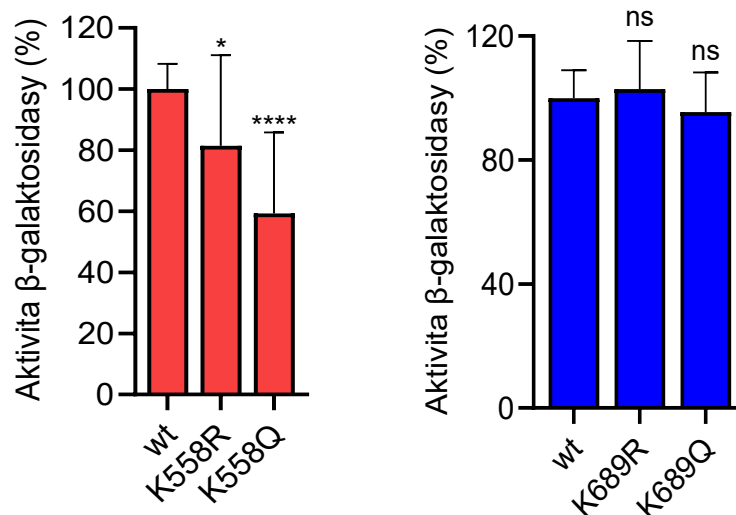
Získaná data ukazují, že zkrácené fragmenty RtxA₅₂₉₋₆₂₃ a RtxA₆₂₄₋₇₁₈ byly stále schopny interagovat s RtxC, což ukazuje že je tato acyltransferasa schopna interagovat s každým z obou acylovaných míst nezávisle. Nicméně, interakce obou zkrácených fragmentů RtxA₅₂₉₋₆₂₃ a RtxA₆₂₄₋₇₁₈ s acyltransferasou RtxC byla v porovnání s interakcí mezi RtxA₅₂₉₋₇₁₈ s RtxC snížena přibližně o 40 %.

5.6 Testování interakcí RtxC se zkrácenými fragmenty proRtxA s mutovanými zbytky K558 a K689

Do genů kódujících zkrácené fúzní proteiny T18-RtxA₅₂₉₋₆₂₃ a T18-RtxA₆₂₄₋₇₁₈ byly vneseny substituce příslušných konzervovaných lysinových zbytků, a to K558R a K558Q, resp. K689R a K689Q. Interakce získaných mutantních variant s RtxC byla testována, dle schématu na obrázku č. 18. Plazmidy byly kotransformovány do buněk *E. coli* BTH101 a následně pěstovány na MacConkey agaru 3 dny při 30 °C. Z ploten bylo zaočkováno několik kolonií do tekutého LB média a bakterie byly kultivovány 14 hodin při 30 °C. Kultury byly použity ke stanovení enzymové aktivity β-galaktosidasy, která je úměrná síle interakce mezi jednotlivými interakčními partnery. Výsledky jsou zobrazeny v grafu č. 6, str. 65.

T25-RtxC ... T18-RtxA ₅₂₉₋₆₂₃ K558R	pKT25-rtxC, KanR + pUT18C-rtxA529-623, AmpR
T25-RtxC ... T18-RtxA ₅₂₉₋₆₂₃ K558Q	pKT25-rtxC, KanR + pUT18C-rtxA529-623, AmpR
T25-RtxC ... T18-RtxA ₆₂₄₋₇₁₈ K689R	pKT25-rtxC, KanR + pUT18C-rtxA624-718, AmpR
T25-RtxC ... T18-RtxA ₆₂₄₋₇₁₈ K689Q	pKT25-rtxC, KanR + pUT18C-rtxA624-718, AmpR

Obrázek č. 18: Kombinace fúzních proteinů pro testování interakcí RtxC se zkrácenými mutantními variantami RtxA₅₂₉₋₆₂₃ a RtxA₆₂₄₋₇₁₈, které nesou substituce konzervovaných lysinových zbytků (K558 resp. K689). Vlevo jsou příslušné kombinace fúzních proteinů, vpravo pak příslušné plazmidy, z nichž byly tyto fúzní proteiny produkovány. U každého plazmidu je uvedeno antibiotikum, vůči kterému nese daný plazmid rezistenci.



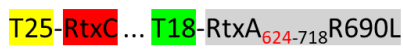
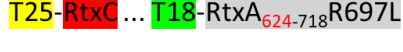
Graf č. 6: Aktivita β-galaktosidasy po interakci mezi RtxC a zkrácenými mutantními variantami RtxA₅₂₉₋₆₂₃ a RtxA₆₂₄₋₇₁₈, které nesou substituce konzervovaných lysinových zbytků (K558 resp. K689), fúzanými s T25, resp. T18. Interakce RtxC s fragmentem RtxA₅₂₉₋₆₂₃, který obsahuje substituce v prvním lysinovém zbytku K558 je znázorněna červenou barvou. Interakce RtxC s fragmentem RtxA₆₂₄₋₇₁₈, který obsahuje substituce v druhém lysinovém zbytku K689 je znázorněna modrou barvou. Výsledná aktivita je přepočtena na procenta, kdy 100 % bylo přiřazeno interakci mezi fúzními proteiny T25-RtxC s T18-RtxA₅₂₉₋₆₂₃ (wt, červená barva) resp. T25-RtxC s T18-RtxA₆₂₄₋₇₁₈ (wt, modrá barva). Výsledky jsou zobrazeny jako průměry se směrodatnou odchylkou ze tří nezávislých experimentů provedených v triplikátu. Data byla vyhodnocena pomocí metody ANOVA (*, $p < 0.05$; ****, $p < 0.0001$; ns, nesignifikantní).

Získaná data ukazují, že substituce konzervovaného lysinového zbytku K558 signifikantně snížily interakci mezi proteiny RtxC a RtxA₅₂₉₋₆₂₃. Na druhé straně, substituce konzervovaného lysinového zbytku K689 neměly žádný vliv na interakci mezi proteiny RtxC a RtxA₆₂₄₋₇₁₈.

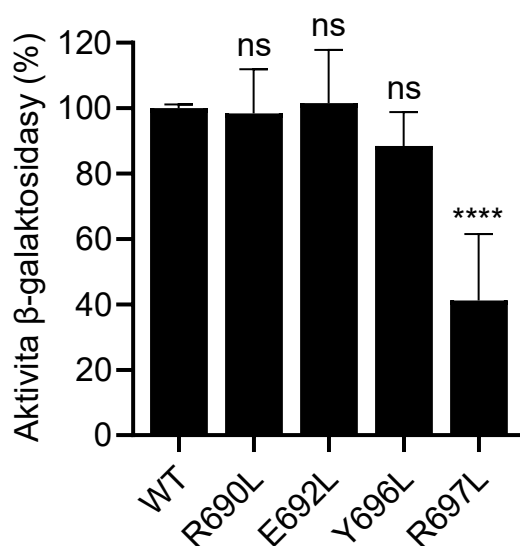
5.7 Testování interakcí mezi RtxC a RtxA₆₂₄₋₇₁₈ s mutacemi v okolí zbytku K689

Na závěr byly testovány interakce acyltransferasy RtxC se zkráceným fragmentem RtxA₆₂₄₋₇₁₈, který nesl substituované zbytky nacházející se v okolí druhého konzervovaného lysinového zbytku K689. K tomuto účelu byly do genu kódujícího fúzní protein T18-RtxA₆₂₄₋₇₁₈ vneseny mutace, které vedly k zavedení substitucí R690L, E692L, Y696L a R697L do proteinu RtxA₆₂₄₋₇₁₈. Interakce získaných mutantních variant s RtxC byla testována dle schématu na obrázku č. 19, str. 66. Plazmidy byly kotransformovány do buněk *E. coli* BTH101, které byly následně pěstovány 3 dny

při 30 °C na MacConkey agaru. Z ploten bylo několik kolonií zaočkováno do tekutého média a poté kultivováno 14 hodin při 30 °C. V takto připravených kulturách byla změřena β -galaktosidasová aktivita, která je úměrná síle interakce mezi jednotlivými interakčními partnery. Výsledky jsou zobrazeny v grafu č. 7.

	pKT25-rtxC, KanR + pUT18C-rtxA624-718, AmpR
	pKT25-rtxC, KanR + pUT18C-rtxA624-718, AmpR
	pKT25-rtxC, KanR + pUT18C-rtxA624-718, AmpR
	pKT25-rtxC, KanR + pUT18C-rtxA624-718, AmpR

Obrázek č. 19: Kombinace fúzních proteinů pro testování interakcí RtxC s fragmentem RtxA₆₂₄₋₇₁₈ nesoucím bodové mutace v okolí druhého konzervovaného lysinového zbytku K689. Vlevo jsou příslušné kombinace fúzních proteinů, vpravo pak příslušné plazmidy, z nichž byly tyto fúzní proteiny produkovány. U každého plazmidu je uvedeno antibiotikum, vůči kterému nese daný plazmid rezistenci.



Graf č. 7: Aktivita β -galaktosidasy po interakci mezi RtxC a mutantními variantami RtxA₆₂₄₋₇₁₈, které nesou substituce v okolí druhého konzervovaného lysinového zbytku K689, fúzovanými s T25, resp. T18. Výsledná aktivita je přepočtena na procenta, kdy 100 % bylo přirazeno interakci mezi T25-RtxC a T18-RtxA₆₂₄₋₇₁₈, bez vnesené substituce (WT). Výsledky jsou zobrazeny jako průměry se směrodatnou odchylkou ze tří nezávislých experimentů provedených v triplikátu. Data byla vyhodnocena pomocí metody ANOVA (****, $p < 0.0001$; ns, nesignifikantní).

Získaná data ukazují, že substituce R697L snížila interakci acyltransferasy RtxC s proteinem RtxA₆₂₄₋₇₁₈ přibližně o 60 %. Na druhé straně, substituce R690L, E692L a Y696L neměly na interakci proteinů RtxC a RtxA₆₂₄₋₇₁₈ žádný vliv.

6 Diskuze

Bakterie *K. kingae* byla donedávna považována za vzácnou příčinu lidských onemocnění. Poprvé byla izolována v roce 1960 a prvních 30 let nebyla považována za patogenní.² Až v 90. letech minulého století postupně narůstal počet odborných publikací řadících tuto bakterii mezi významné invazivní pediatrické patogeny.⁴

K. kingae působí cytotoxicky na různé typy buněk, a to díky sekreci toxinu RtxA, který patří do rodiny RTX cytotoxinů produkovaných různými patogenními bakteriemi.⁴⁹ RtxA se po sekreci z bakteriální buňky váže na povrchové glykosylované struktury hostitelských buněk a následně se vkládá do jejich membrány, ve které tvoří kation-selektivní póry. Ty poté narušují iontovou homeostázu buňky a ve větším počtu vedou k lýze napadené buňky.⁶⁷

RtxA i jiné RTX toxiny jsou syntetizovány v neaktivní formě protoxinů, které je nutné aktivovat v bakteriálním cytosolu. Aktivace protoxinu proRtxA spočívá v kovalentní acylaci dvou konzervovaných lysinových zbytků K558 a K689 prostřednictvím specifické acyltransferasy RtxC, která využívá acyl-ACP jako donor mastných kyselin.⁴⁹ Tento způsob je poměrně unikátní, protože většina známých acyltransferas využívá k modifikaci různých bakteriálních, archeálních a eukaryotických substrátů jako donor acylů acyl-CoA.^{101,102} I přes tento fakt jsou molekulární mechanismy acylace RTX toxinů poměrně málo prostudovány a jejich další studium může přinést řadu nových poznatků. Ty by mohly napomoci při hledání specifických inhibitorů acylace RTX toxinů, neboť pouze acylací aktivované RTX toxiny působí jako vysoce účinné „kontaktní zbraně“, které pronikají a permeabilizují membrány hostitelských buněk a přispívají tak k patogenezi onemocnění.

Nedávno bylo ukázáno, že acyltransferasa CyaC si ze zásob acyl-ACP v *E. coli* přednostně vybírá ACP molekuly přenášející řetězce C16:0 nebo C16:1, a to pro acylaci substrátů proCyaA, proHlyA i proRtxA. Naproti tomu acyltransferasy HlyC a RtxC si vybírají k acylaci všech tří zmíněných protoxinů téměř výhradně ACP s kratším řetězcem C14:0 nebo C14:0-OH. To ukazuje, že je to právě acyltransferasa RTX, která si vybírá acylový řetězec dané délky, který následně přenese na substrát proRTXA.⁸¹ Jakým způsobem dosahují acyltransferasy RTX tak přesné selektivity délky acylových řetězců je zajímavou otázkou nejen v rámci celé enzymologie, ale také biochemie lipidů i designu proteinů. Předpokládá se, že vysoká selektivita RTX acyltransferas pro délku

acylových řetězců, které jsou přenášeny na substráty, může záviset na určitém typu tzv. molekulárního pravítka v molekule acyltransferas RTX. Tato pravítka byla totiž již dříve identifikována u acyltransferas LpxA a LpxD, které přenášejí acyly z acyl-ACP při biosyntéze lipidů A u různých bakterií. Například záměna methioninového zbytku s dlouhým postranním řetězcem za glycinový zbytek bez postranního řetězce (M169G) v acyltransferase LpxA bakterie *Pseudomonas aeruginosa* vedla ke změně substrátové specifity tohoto enzymu z hydroxydekanoyl-ACP na hydroxymyristoyl-ACP.⁴⁶

Jediná acyltransferasa aktivující RTX protoxin, pro kterou byla vyřešena rentgenová struktura, je ApxIC z bakterie *A. pleuropneumoniae*. Kombinace mnoha přístupů ukázala, že ApxIC tvoří homodimerní komplex, v němž dochází k interakce mezi jednotlivými monomery prostřednictvím N-koncových α -helixů. Každý monomer ApxIC obsahuje aktivní místo v hlubokém povrchovém žlábků nesoucím zbytky H24, N35 a D93, u kterých se předpokládá, že hrají zásadní roli v katalýze daného enzymu.⁵⁰

Doposud se nikomu nepodařilo získat ani rentgenovou, ani cryo-EM strukturu ternárního komplexu mezi acyltransferasou RTX, acyl-ACP a protoxinem proRTXA, a segmenty či jednotlivé aminokyselinové zbytky podílející se na interakci těchto proteinů tak zůstávají neznámé. Cílem této diplomové práce proto bylo na základě testování interakcí RtxC s ACP, proRtxA a jejich mutantními variantami identifikovat zbytky, které jsou za příslušné interakce zodpovědné.

Pro testování proteinových interakcí byl využit bakteriální dvouhybridní systém. Nejprve byly testovány interakce mezi RtxC a ACP. Oba proteiny byly nejprve fúzovány s N- nebo C- koncem T25, resp. T18 fragmentu AC enzymu. Ověření všech 4 kombinací pak vedlo k závěru, že nejlépe interagovali tři dvojice fúzních proteinů, a to T25-RtxC s T18-ACP, T25-RtxC s ACP-T18 a RtxC-T25 s T18-ACP. Na úrovni negativní kontroly interagovala dvojice RtxC-T25 s ACP-T18. Můžeme předpokládat, že snížená interakce u poslední dvojice fúzních proteinů byla způsobena tím, že při interakci proteinů RtxC s ACP byly fragmenty T25 a T18 od sebe tak vzdálené, že nedošlo k jejich složení do funkčního AC enzymu, nebo že pozice fragmentů T25 a T18 stericky bránila interakci mezi proteiny RtxC a ACP.

Na základě získaných výsledků byla pro následující stanovení využita dvojice fúzních proteinů RtxC-T25 a T18-ACP. Do proteinové sekvence ACP byly zavedeny alaninové substituce negativně nabitých zbytků D36, D39, E48, E49, D57 a E61, které

by na základě interakčního modelu mezi RtxC a ACP mohly interagovat s pozitivně nabitými zbytky acyltransferasy RtxC (Dr. J. Černý, BTÚ AV ČR). Všechny připravené mutantní varianty ACP byly u nás v laboratoři také využity ke studiu interakcí s acyltransferasami HlyC a CyaC. Mutantní varianty ACP se substitucí D36A, D39A nebo D57A vykazovaly významně sníženou interakci nejen s acyltransferasou RtxC, ale také s acyltransferasami HlyC a CyaC. Na druhé straně, substituce E61A neměla na interakci ACP ani s jednou z těchto tří acyltransferas signifikantní vliv. Odlišné výsledky interakcí pro jednotlivé acyltransferasy byly naměřeny u zavedených substitucí E48A a E49A v ACP. Zatímco tyto substituce neměly žádný vliv na interakci ACP s RtxC, významně snížily interakci ACP jak s HlyC, tak s CyaC.

Na základě interakčního modelu mezi RtxC a ACP byly také navrženy substituce pozitivně nabitých zbytků v acyltransferase RtxC, o kterých se předpokládá, že by mohly interagovat s ACP. Příprava daných mutantních variant RtxC a měření jejich interakce s ACP bude předmětem další práce.

Následně byly testovány interakce mezi RtxC a RtxA₅₂₉₋₇₁₈. Oba proteiny byly ke stanovení nejlépe interagující dvojice nejprve fúzovány s N- nebo C-koncem T25, resp. T18 fragmentu AC enzymu. Na základě výsledků byla zvolena jako nejlépe interagující dvojice T25-RtxC s T18-RtxA₅₂₉₋₇₁₈. U ostatních kombinací fúzních proteinů byla naměřena snížená interakce, jejíž příčinou může být pro interakci nevhodné prostorové napojení RtxC na T25, popřípadě RtxA₅₂₉₋₇₁₈ na T18.

Po zvolení nejlépe interagující dvojice fúzních proteinů, T25-RtxC a T18-RtxA₅₂₉₋₇₁₈, byly do proteinu RtxA₅₂₉₋₇₁₈ zavedeny substituce v konzervovaných lysinových zbytcích, a to K558R, K558Q, K689R, K689Q, K558R+K689R a K558Q+K689Q. Tyto substituce měly objasnit, zda se konzervované lysinové zbytky K558 a K689 účastní samotné interakce protoxinu proRtxA s RtxC, nebo jsou jenom akceptory acylových zbytků. Testování interakce mezi RtxC a mutantními variantami RtxA₅₂₉₋₇₁₈ ukázalo, že pokud jsou substituovány jednotlivé konzervované lysinové zbytky v proteinové sekvenci RtxA₅₂₉₋₇₁₈, nemá to vliv na danou interakci. Až po substituci obou zbytků K558 a K689 současně, byl viditelný mírný pokles interakce RtxA₅₂₉₋₇₁₈ s RtxC. Nicméně, z daného měření nebylo možné stanovit, který z konzervovaných lysinových zbytků by se mohl účastnit interakce mezi RtxA₅₂₉₋₇₁₈ a RtxC.

Proto byl fragment RtxA₅₂₉₋₇₁₈ rozdělen na dvě kratší varianty, a to RtxA₅₂₉₋₆₂₃ a RtxA₆₂₄₋₇₁₈, z nichž každá nesla právě jedno acylační místo s jedním z konzervovaných lysinových zbytků (K558, resp. K689). Nejdříve byla stanovena interakce mezi RtxC a zkrácenými fragmenty RtxA₅₂₉₋₆₂₃ a RtxA₆₂₄₋₇₁₈, a následně do nich byly vneseny substituce K558R a K558Q, resp. K689R a K689Q. Ukázalo se, že substituce zbytku K689 nemají žádný vliv na interakci RtxA₆₂₄₋₇₁₈ s RtxC. Naproti tomu, substituce zbytku K558 vedly ke snížení interakce mezi RtxA₅₂₉₋₆₂₃ a RtxC, což by mohlo vysvětlovat snížení interakce mezi RtxC a fragmentem RtxA₅₂₉₋₇₁₈, v němž byly substituovány oba konzervované lysinové zbytky zároveň.

Jelikož bylo prokázáno, že se konzervovaný lysinový zbytek K689 neúčastní interakce proRtxA s RtxC, byly do jeho okolí vneseny bodové substituce, které by danou interakci mohly ovlivnit. Do zkráceného fragmentu RtxA₆₂₄₋₇₁₈ byly zavedeny substituce R690L, E692L, Y696L a R697L. Z daných substitucí vedla k významnému snížení interakce mezi RtxA₆₂₄₋₇₁₈ a RtxC pouze substituce R697L. To ukazuje, že je zbytek R697, na rozdíl od třech dalších testovaných, důležitý pro interakci mezi proRtxA a RtxC. Do budoucna je plánována příprava dalších mutantních variant proRtxA v této oblasti a testování jejich interakce s RtxC.

V této diplomové práci byla za využití bakteriálního dvouhybridního systému studována interakce mezi acyltransferasou RtxC, acyl-ACP a protoxinem proRtxA. V proteinu ACP se podařilo úspěšně nalézt několik zbytků (D36, D39 a D57), které byly zapojeny do jeho interakce s RtxC. Substituce dvou konzervovaných lysinových zbytků proteinu proRtxA pak ukázaly, že by se zbytek K558, na rozdíl od zbytku K689, mohl uplatňovat nejen jako akceptor acylu, ale i v interakci s acyltransferasou RtxC. Jako další zbytek v protoxinu, který by se mohl podílet na jeho interakci s RtxC pak byl identifikován zbytek R697, nacházející se ve druhém acylačním místě, v blízkosti konzervovaného zbytku K689.

7 Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na testování proteinových interakcí pomocí bakteriálního dvouhybridního systému. Byly studovány interakce mezi acyltransferasou RtxC a acyl-ACP, resp. protoxinem proRtxA. Do proteinů ACP a proRtxA byly na základě výsledků z predikčních algoritmů úspěšně zavedeny substituce vytipovaných aminokyselinových zbytků. U získaných mutantních variant ACP a proRtxA byla následně testována jejich interakce s RtxC, přičemž se podařilo nalézt několik zbytků, které se podílely na studovaných interakcích. Výsledky získané v této práci lze shrnout následovně:

- Negativně nabitě aspartátové zbytky D36, D39 a D57 proteinu ACP se podílejí na jeho interakci s acyltransferasou RtxC.
- Konzervovaný lysinový zbytek K558 proteinu proRtxA není pouhým akceptorem acylového řetězce, ale také se částečně podílí na jeho interakci s RtxC.
- Konzervovaný lysinový zbytek K689 proteinu proRtxA nemá na jeho interakci s RtxC žádný vliv.
- Aminokyselinový zbytek R697 proteinu proRtxA se podílí na jeho interakci s RtxC.

Seznam použité literatury

1. Yagupsky, P., Porsch, E. & St Geme, J. W. *Kingella kingae*: An Emerging Pathogen in Young Children. *Pediatrics* **127**, 557–565 (2011).
2. Henriksen, S. D. & Bovre, K. *Moraxella kingii* sp.nov., a haemolytic, saccharolytic species of the genus *Moraxella*. *J Gen Microbiol* **51**, 377–385 (1968).
3. Yagupsky, P. *Kingella kingae*: from medical rarity to an emerging paediatric pathogen. *Lancet Infect Dis* **4**, 358–367 (2004).
4. Yagupsky, P. *Kingella kingae*: Carriage, Transmission, and Disease. (2015) doi:10.1128/CMR.00028-14.
5. Maldonado, R., Wei, R., Kachlany, S. C., Kazi, M. & Balashova, N. V. Cytotoxic effects of *Kingella kingae* outer membrane vesicles on human cells. *Microb Pathog* **51**, 22–30 (2011).
6. Yagupsky, P., Dagan, R., Prajgrod, F. & Merires, M. Respiratory carriage of *Kingella kingae* among healthy children. *Pediatr Infect Dis J* **14**, 673–678 (1995).
7. Weiss-Salz, I. & Yagupsky, P. *Kingella kingae* infections in children: An update. *Adv Exp Med Biol* **719**, 67–80 (2011).
8. Yagupsky, P., Peled, N. & Katz, O. Epidemiological features of invasive *Kingella kingae* infections and respiratory carriage of the organism. *J Clin Microbiol* **40**, 4180–4184 (2002).
9. Yagupsky, P. Diagnosing *Kingella kingae* infections in infants and young children. *Expert Rev Anti Infect Ther* **15**, 925–934 (2017).
10. Wong, M., Williams, N. & Cooper, C. Systematic Review of *Kingella kingae* Musculoskeletal Infection in Children: Epidemiology, Impact and Management Strategies. *Ped Health* (2020) doi:10.2147/PHMT.S217475.
11. Ferber, B., Bruckheimer, E., Schlesinger, Y., Berger, I., Glaser, J., Olsha, O., Branski, D. & Kerem, E. *Kingella kingae* endocarditis in a child with hair-cartilage hypoplasia. *Pediatr Cardiol* **18**, 445–446 (1997).
12. Kennedy, C. A. & Rosen, H. *Kingella kingae* bacteremia and adult epiglottitis in a granulocytopenic host. *Am J Med* **85**, 701–702 (1988).
13. Kugler, K. C., Biedenbach, D. J. & Jones, R. N. Determination of the antimicrobial activity of 29 clinically important compounds tested against fastidious HACEK group organisms. *Diagn Microbiol Infect Dis* **34**, 73–76 (1999).
14. Weir, S. & Marrs, C. F. Identification of type 4 pili in *Kingella denitrificans*. *Infect Immun* **60**, 3437 (1992).

15. St. Geme, J. W., Porsch, E. A. & Kehl-Fie, T. E. Modulation of *Kingella kingae* adherence to human epithelial cells by type IV Pili, capsule, and a novel trimeric autotransporter. *mBio* **3**, (2012).
16. Bonacorsi, S., Yagupsky, P. & Porsch, E. A. Citation: Porsch, E.A. *Kingella kingae* Virulence Factors and Insights into microorganisms *Kingella kingae* Virulence Factors and Insights into Pathogenicity. (2022) doi:10.3390/microorganisms10050997.
17. Kehl-Fie, T. E., Porsch, E. A., Miller, S. E. & St. Geme, J. W. Expression of *Kingella kingae* type IV pili is regulated by σ 54, PilS, and PilR. *J Bacteriol* **191**, 4976–4986 (2009).
18. Kehl-Fie, T. E., Porsch, E. A., Yagupsky, P., Grass, E. A., Obert, C., Benjamin, D. K. & St Geme, J. W. Examination of Type IV Pilus Expression and Pilus-Associated Phenotypes in *Kingella kingae* Clinical Isolates. *Infect Immun* **78**, 1692–1699 (2010).
19. Sacharok, A. L., Porsch, E. A., Yount, T. A., Keenan, O. & Geme, J. W. S. *Kingella kingae* PilC1 and PilC2 are adhesive multifunctional proteins that promote bacterial adherence, twitching motility, DNA transformation, and pilus biogenesis. *PLoS Pathog* **18**, (2022).
20. Chometon, S., Benito, Y., Chaker, M., Boisset, S., Ploton, C., Bérard, J., Vandenesch, F. & Freydiere, A. M. Specific real-time polymerase chain reaction places *Kingella kingae* as the most common cause of osteoarticular infections in young children. *Pediatr Infect Dis J* **26**, 377–381 (2007).
21. Kehl-Fie, T. E. & St. Geme, J. W. Identification and characterization of an RTX toxin in the emerging pathogen *Kingella kingae*. *J Bacteriol* **189**, 430–436 (2007).
22. Ceroni, D., Cherkaoui, A., Ferey, S., Kaelin, A. & Schrenzel, J. *Kingella kingae* osteoarticular infections in young children: clinical features and contribution of a new specific real-time PCR assay to the diagnosis. *J Pediatr Orthop* **30**, 301–304 (2010).
23. Filipi, K., Rahman, W. U., Osickova, A. & Osicka, R. *Kingella kingae* RtxA Cytotoxin in the Context of Other RTX Toxins. *Microorganisms* **10**, (2022).
24. El Houmami, N., Bzdreng, J., Durand, G. A., Minodier, P., Seligmann, H., Prudent, E., Bakour, S., Bonacorsi, S., Raoult, D., Yagupsky, P. & Fournier, P. E. Molecular tests that target the RTX locus do not distinguish between *Kingella kingae* and the recently described *Kingella negevensis* Species. *J Clin Microbiol* **55**, 3113–3122 (2017).
25. El Houmami, N., Bakour, S., Bzdrenga, J., Rathored, J., Seligmann, H., Robert, C., Armstrong, N., Schrenzel, J., Raoult, D., Yagupsky, P. & Fournier, P. E. Isolation and characterization of *Kingella negevensis* sp. nov., a novel *Kingella species* detected in a healthy paediatric population. *Int J Syst Evol Microbiol* **67**, 2370–2376 (2017).

26. Chang, D. W., Nudell, Y. A., Lau, J., Zakharian, E. & Balashova, N. V. RTX toxin plays a key role in *Kingella kingae* virulence in an infant rat model. *Infect Immun* **82**, 2318–2328 (2014).
27. Porsch, E. A., Starr, K. F., Yagupsky, P. & St. Geme, J. W. The Type a and Type b Polysaccharide Capsules Predominate in an International Collection of Invasive *Kingella kingae* Isolates. *mSphere* **2**, (2017).
28. Starr, K. F., Porsch, E. A., Seed, P. C., Heiss, C., Naran, R., Forsberg, L. S., Amit, U., Yagupsky, P., Azadi, P. & St. Geme, Joseph W. *Kingella kingae* Expresses Four Structurally Distinct Polysaccharide Capsules That Differ in Their Correlation with Invasive Disease. *PLoS Pathog* **12**, (2016).
29. Basmaci, R., Bidet, P., Mallet, C., Vialle, R. & Bonacorsi, S. Distribution of *Kingella kingae* Capsular Serotypes in France Assessed by a Multiplex PCR Assay on Osteoarticular Samples. *J Clin Microbiol* **56**, (2018).
30. Dusch, H., Zbinden, R. & Von Graevenitz, A. Growth differences of Capnocytophaga canimorsus strains and some other fastidious organisms on various Columbia-based blood agar media. *Zentralblatt für Bakteriologie* **282**, 362–366 (1995).
31. Frøholm, L. O. & BøVRE, K. Fimbriation Associated with The Spreading-Corroding Colony Type in *Moraxella kingii*. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology and Immunology* **80B**, 641–648 (1972).
32. Froholm, L. O. & Bovre, K. Density Gradient Centrifugation in Urografin of *Moraxella* And *Kingella* Cells and Appendages. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology* **86B**, 77–86 (1978).
33. Ødum, L. & Frederiksen, W. Identification and Characterization of *Kingella kingae*. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology* **89B**, 311–315 (1981).
34. Moumile, K., Merckx, J., Glorion, C., Pouliquen, J.C., Berche, P. & Ferroni, A. Bacterial aetiology of acute osteoarticular infections in children. *Acta Paediatr* **94**, 419–422 (2005).
35. Dubnov-Raz, G., Ephros, M., Garty, B. Z., Schlesinger, Y., Maayan-Metzger, A., Hasson, J., Kassis, I., Schwartz-Harari, O. & Yagupsky, P. Invasive pediatric *Kingella kingae* infections: A nationwide collaborative study. *Pediatric Infectious Disease Journal* **29**, 639–643 (2010).
36. Verdier, I., Gayet-Ageron, A., Ploton, C., Ingenior, Y. B., Freydiere, A. M., Chotel, F., Bérard, J., Vanhems, P. & Vandenesch, F. Contribution of a broad range polymerase chain reaction to the diagnosis of osteoarticular infections caused by *Kingella kingae*: description of twenty-four recent pediatric diagnoses. *Pediatr Infect Dis J* **24**, 692–696 (2005).
37. Aupiais, C., Ilharreborde, B., Doit, C., Blachier, A., Desmarest, M., Job-Deslandre, C., Mazda, K., Faye, A., Bonacorsi, S., Alberti, C. & Lorrot, M.

- Aetiology of arthritis in hospitalised children: an observational study. *Arch Dis Child* **100**, 742–747 (2015).
38. Ilharreborde, B., Bidet, P., Lorrot, M., Even, J., Mariani-Kurkdjian, P., Liguori, S., Vitoux, C., Lefevre, Y., Doit, C., Fitoussi, F., Penneçot, G., Bingen, E., Mazda, K. & Bonacorsi, S. New real-time PCR-based method for *Kingella kingae* DNA detection: application to samples collected from 89 children with acute arthritis. *J Clin Microbiol* **47**, 1837–1841 (2009).
 39. Osickova, A., Balashova, N., Masin, J., Sulc, M., Roderova, J., Wald, T., Brown, A. C., Koufos, E., Chang, E. H., Giannakakis, A., Lally, E. T. & Osicka, R. Cytotoxic activity of *Kingella kingae* RtxA toxin depends on post-translational acylation of lysine residues and cholesterol binding. *Emerg Microbes Infect* **7**, (2018).
 40. Linhartova, I., Bumba, L., Masin, J., Basler, M., Osicka, R., Kamanova, J., Prochazkova, K., Adkins, I. Hejnova-Holubova, J., Sadilkova, L., Morova, J. & Sebo, P. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol Rev* **34**, 1076–1112 (2010).
 41. Morreale, D. P., Porsch, E. A., Kern, B. K., St. Geme, J. W. & Planet, P. J. Acquisition, co-option, and duplication of the rtx toxin system and the emergence of virulence in *Kingella*. *Nat Commun* **14**, (2023).
 42. Linhartova, I., Osicka, R., Bumba, L., Masin, J. & Sebo, P. RTX Toxins: A Review. *Microbial Toxins* 1–29 (2015)
 43. Welch, R. A. & Pellett, S. Transcriptional organization of the *Escherichia coli* hemolysin genes. *J Bacteriol* **170**, 1622–1630 (1988).
 44. Wandersman, C. & Delepelaire, P. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4776–4780 (1990).
 45. Glaser, P., Sakamoto, H., Bellalou, J., Ullmann, A. & Danchin, A. Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *EMBO J* **7**, 3997–4004 (1988).
 46. Srikhanta, Y. N., Fox, K. L. & Jennings, M. P. The phasevarion: phase variation of type III DNA methyltransferases controls coordinated switching in multiple genes. *Nat Rev Microbiol* **8**, 196–206 (2010).
 47. Srikhanta, Y. N. *et al.* Phasevarion-Regulated Virulence in the Emerging Pediatric Pathogen *Kingella kingae*. *Infect Immun* **85**, (2017).
 48. Ostolaza, H. & Amuategi, J. Membrane Interaction Characteristics of the RTX Toxins and the Cholesterol-Dependence of Their Cytolytic/Cytotoxic Activity. *International Journal of Molecular Sciences* 2024, Vol. 25, Page 3131 **25**, 3131 (2024).

49. Kehl-Fie, T. E. & St. Geme, J. W. Identification and characterization of an RTX toxin in the emerging pathogen *Kingella kingae*. *J Bacteriol* **189**, 430–436 (2007).
50. Greene, N. P., Crow, A., Hughes, C. & Koronakis, V. Structure of a bacterial toxin-activating acyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E3058–E3066 (2015).
51. Delepelaire, P. Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1694**, 149–161 (2004).
52. Thomas, S., Holland, I. B. & Schmitt, L. The Type I secretion pathway-The hemolysin system and beyond ☆. (2013) doi:10.1016/j.bbamcr.2013.09.017.
53. Higgins, C. F., Hiles, I. D., Salmond, G. P.C., Gill, D. R., Downie, J. A., Evans, I. J., Holland, I. B., Gray, L., Buckel, S. D., Bell, A. W. & Hermodson, M. A. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* **323**, 448–450 (1986).
54. Balakrishnan, L., Hughes, C. & Koronakis, V. Substrate-triggered recruitment of the TolC channel-tunnel during type I export of hemolysin by *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **313**, 501–510 (2001).
55. Welch, R. A. RTX Toxin Structure and Function: A Story of Numerous Anomalies and Few Analogies in Toxin Biology. *Curr Top Microbiol Immunol* **257**, 85–111 (2001).
56. 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* **272**, 30463–20469 (1997).
57. Guermonprez, P., Khelef, N., Blouin, E., Rieu, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Guiso, N., Ladant, D. & Leclerc, C. The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *J Exp Med* **193**, 1035–1044 (2001).
58. Balashova, N. V., Crosby, J. A., Al Ghofaily, L. & Kachlany, S. C. Leukotoxin confers beta-hemolytic activity to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* **74**, 2015–2021 (2006).
59. Murphy, G. L., Whitworth, L. C., Clinkenbeard, K. D. & Clinkenbeard, P. A. Hemolytic activity of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect Immun* **63**, 3209–3212 (1995).
60. Arnaout, M. Structure and Function of the Leukocyte Adhesion Molecules CD11/CD18. *Blood* **75**, 1037–1050 (1990).
61. Fagerholm, S. C., Guenther, C., Asens, M. L., Savinko, T. & Uotila, L. M. Beta2-Integrins and Interacting Proteins in Leukocyte Trafficking, Immune Suppression, and Immunodeficiency Disease. *Front Immunol* **10**, (2019).

62. Forman, M. S., Nishikubo, J. B., Han, R. K., Le, A., Balashova, N. V. & Kachlany, S. C. Gangliosides block *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* leukotoxin (LtxA)-mediated hemolysis. *Toxins (Basel)* **2**, 2824–2836 (2010).
63. Cortajarena, A. L., Goni, F. M. & Ostolaza, H. Glycophorin as a receptor for *Escherichia coli* alpha-hemolysin in erythrocytes. *J Biol Chem* **276**, 12513–12519 (2001).
64. Rahman, W. U., Osickova, A., Klimova, N., Lora, J., Balashova, N & Osicka, R. Binding of *Kingella kingae* RtxA Toxin Depends on Cell Surface Oligosaccharides, but Not on β 2 Integrins. *International Journal of Molecular Sciences Article* doi:10.3390/ijms21239092.
65. Vazquez, R. F., Mate, S. M., Bakas, L. S., Fernandez, M. M., Malchiodi, E. L. & Herlax, V. S. Novel evidence for the specific interaction between cholesterol and α -haemolysin of *Escherichia coli*. *Biochem J* **458**, 481–489 (2014).
66. Baier, C. J., Fantini, J. & Barrantes, F. J. Disclosure of cholesterol recognition motifs in transmembrane domains of the human nicotinic acetylcholine receptor. *Sci Rep* **1**, (2011).
67. Jorgensen, S. E., Mulcahy, P. F., Wu, G. K. & Louis, C. F. Calcium accumulation in human and sheep erythrocytes that is induced by *Escherichia coli* hemolysin. *Toxicon* **21**, 717–727 (1983).
68. Bhakdi, S., Mackman, N., Nicaud, J. M. & Holland, I. B. *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infect Immun* **52**, 63–69 (1986).
69. Barcena-Uribarri, I., Benz, R., Winterhalter, M., Zakharian, E. & Balashova, N. Pore forming activity of the potent RTX-toxin produced by pediatric pathogen *Kingella kingae*: Characterization and comparison to other RTX-family members. *Biochim Biophys Acta* **1848**, 1536–1544 (2015).
70. Hyland, C., Vuillard, L., Hughes, C. & Koronakis, V. Membrane interaction of *Escherichia coli* hemolysin: flotation and insertion-dependent labeling by phospholipid vesicles. *J Bacteriol* **183**, 5364–5370 (2001).
71. Benz, R., Maier, E., Ladant, D., Ullmann, A. & Sebo, P. Adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 27231–27239 (1994).
72. Basler, M., Knapp, O., Masin, J., Fiser, R., Maier, E., Benz, R., Sebo, P. & Osicka, R. Segments crucial for membrane translocation and pore-forming activity of *Bordetella* adenylate cyclase toxin. *J Biol Chem* **282**, 12419–12429 (2007).
73. Roderova, J., Osickova, A., Sukova, A., Mikusova, G., Fiser, R., Sebo, P., Osicka, R. & Masin, J. Residues 529 to 549 participate in membrane penetration and pore-forming activity of the *Bordetella* adenylate cyclase toxin. *Sci Rep* **9**, (2019).

74. Menestrina, G., Mackman, N., Holland, I. B. & Bhakdi, S. *Escherichia coli* haemolysin forms voltage-dependent ion channels in lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **905**, 109–117 (1987).
75. Benz, R., Schmid, A., Wagner, W. & Goebel, W. Pore formation by the *Escherichia coli* hemolysin: evidence for an association-dissociation equilibrium of the pore-forming aggregates. *Infect Immun* **57**, 887–895 (1989).
76. Benz, R., Janko, K. & Lauger, P. Ionic selectivity of pores formed by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **551**, 238–247 (1979).
77. Benz, R., Hardie, K. R. & Hughes, C. Pore formation in artificial membranes by the secreted hemolysins of *Proteus vulgaris* and *Morganella morganii*. *Eur J Biochem* **220**, 339–347 (1994).
78. 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* **44**, 12759–12766 (2005).
79. Rogel, A., Meller, R. & Hanski, E. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. The relationship between induction of cAMP and hemolysis. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 3154–3161 (1991).
80. Bejerano, M., Nisan, I., Ludwig, A., Goebel, W. & Hanski, E. Characterization of the C-terminal domain essential for toxic activity of adenylate cyclase toxin. *Mol Microbiol* **31**, 381–392 (1999).
81. Osickova, A., Khaliq, H., Masin, J., Jurnecka, D., Sukova, A., Fiser, R., Holubova, J., Stanek, O., Sebo, P. & Osicka, R. Acyltransferase-mediated selection of the length of the fatty acyl chain and of the acylation site governs activation of bacterial RTX toxins. *J Biol Chem* **295**, 9268–9280 (2020).
82. Hackett, M., Walker, C. B., Guo, L., Gray, M. C., Van Cuyk, S., Ullmann, A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Hewlett, E. L. & Sebo, P. Hemolytic, but not cell-invasive activity, of adenylate cyclase toxin is selectively affected by differential fatty-acylation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**, 20250–20253 (1995).
83. Herlax, V., Mate, S., Rimoldi, O. & Bakas, L. Relevance of fatty acid covalently bound to *Escherichia coli* alpha-hemolysin and membrane microdomains in the oligomerization process. *J Biol Chem* **284**, 25199–25210 (2009).
84. Lee, S. J., Gray, M. C., Zu, K. & Hewlett, E. L. Oligomeric behavior of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin in solution. *Arch Biochem Biophys* **438**, 80–87 (2005).
85. 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* **23**, 2831–2843 (2009).

86. Cafarelli, T. M., Desbuleux, A., Wang, Y., Choi, S. G., De Ridder, D. & Vidal, M. Mapping, modeling, and characterization of protein-protein interactions on a proteomic scale. *Curr Opin Struct Biol* **44**, 201–210 (2017).
87. Stynen, B., Tournu, H., Tavernier, J. & Van Dijck, P. Diversity in genetic in vivo methods for protein-protein interaction studies: from the yeast two-hybrid system to the mammalian split-luciferase system. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**, 331–382 (2012).
88. Miller, K. E., Kim, Y., Huh, W. K. & Park, H. O. Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis: Advances and Recent Applications for Genome-Wide Interaction Studies. *J Mol Biol* **427**, 2039–2055 (2015).
89. Fields, S. & Song, O. K. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245–246 (1989).
90. Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A. & Ladant, D. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. **95**, 5752–5756 (1998).
91. Battesti, A. & Bouveret, E. The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli*. *Methods* **58**, 325–334 (2012).
92. Fransen, M., Brees, C., Ghys, K., Amery, L., Mannaerts, G. P., Ladant, D. & Van Veldhoven, P. P. Analysis of Mammalian Peroxin Interactions Using a Non-transcription-based Bacterial Two-hybrid Assay*. (2002)
doi:10.1074/mcp.M100025-MCP200.
93. Ladant, D. A Bacterial Two-Hybrid System for In Vivo Assays of Protein-Protein Interactions and Drug Discovery. *Methods in Molecular Biology* **2548**, 145–167 (2022).
94. Chenal, A. & Ladant, D. Bioengineering of *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin for Antigen-Delivery and Immunotherapy. *Toxins (Basel)* **10**, (2018).
95. Guo, Q., Shen, Y., Lee, Y. S., Gibbs, C. S., Mrksich, M., Tang, W. J. Structural basis for the interaction of *Bordetella pertussis* adenylyl cyclase toxin with calmodulin. *EMBO J* **24**, 3190–3201 (2005).
96. Ladant, D. Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with calmodulin. Identification of two separated calmodulin-binding domains. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 2612–2618 (1988).
97. Busby, S. & Ebright, R. H. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol* **293**, 199–213 (1999).
98. Karimova, G., Ullmann, A. & Ladant, D. A bacterial two-hybrid system that exploits a cAMP signaling cascade in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **328**, 59–73 (2000).

99. Ouellette, S. P., Karimova, G., Davi, M. & Ladant, D. Analysis of Membrane Protein Interactions with a Bacterial Adenylate Cyclase-Based Two-Hybrid (BACTH) Technique. *Curr Protoc Mol Biol* **118**, 20.12.1-20.12.24 (2017).
100. Olson, M. G., Goldammer, M., Gaudiard, E., Ladant, D. & Ouellette, S. P. A Bacterial Adenylate Cyclase-Based Two-Hybrid System Compatible with Gateway® Cloning HHS Public Access. *Methods Mol Biol* **1794**, 75–96 (2018).
101. Puthenveetil, R., Gomez-Navarro, N. & Banerjee, A. Access and utilization of long chain fatty acyl-CoA by zDHHC protein acyltransferases. *Curr Opin Struct Biol* **77**, 102463 (2022).
102. Chen, G., Harwood, J. L., Lemieux, M. J., Stone, S. J. & Weselake, R. J. Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase: Properties, physiological roles, metabolic engineering and intentional control. *Prog Lipid Res* **88**, (2022).