

MASARYKOVA UNIVERZITA

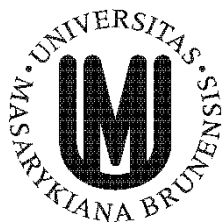
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

ÚSTAV BIOCHEMIE

Diplomová práce

Brno 2017

Bc. Lukáš Gajdoš



MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
ÚSTAV BIOCHEMIE



PŘÍPRAVA A
CHARAKTERIZACE
LEKTINŮ Z BAKTERIE
PHOTORHABDUS
LUMINESCENS

Diplomová práce

Bc. Lukáš Gajdoš

Bibliografický záznam

Autor:	Lukáš Gajdoš Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav biochemie
Název práce:	Příprava a charakterizace lektinů z bakterie <i>Photorhabdus luminescens</i>
Studijní program:	Biochemie
Studijní obor:	Analytická biochemie
Vedoucí práce:	prof. RNDr. Michaela Wimmerová, Ph.D.
Akademický rok:	2016/2017
Počet stran:	66+1
Klíčová slova:	<i>Photorhabdus luminescens</i> ; lektiny; proteinová krystalizace; bakteriální lektiny; charakterizace proteinů

Bibliografický záznam

Autor: Lukáš Gajdoš
Prírodovedecká fakulta, Masarykova univerzita
Ústav biochémie

Názov práce: Príprava a charakterizácia lektínov z baktérie
Photorhabdus luminescens

Študijný program: Biochémia

Študijný odbor: Analytická biochémia

Vedúci práce: prof. RNDr. Michaela Wimmerová, Ph.D.

Akademický rok: 2016/2017

Počet strán: 66+1

Kľúčové slová: *Photorhabdus luminescens*; lektíny; proteínová kryštalizácia; bakteriálne lektíny; charakterizácia proteínov

Bibliographic Entry

Author: Lukáš Gajdoš
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Biochemistry

Title of Thesis: Preparation and characterization of lectins from bacterium
Photorhabdus luminescens

Degree programme: Biochemistry

Field of Study: Analytical Biochemistry

Supervisor: prof. RNDr. Michaela Wimmerová, Ph.D.

Academic Year: 2016/2017

Number of Pages: 66+1

Keywords: *Photorhabdus luminescens*; lectins; protein
crystallization; bacterial lectins; protein characterization;

Abstrakt

Lektiny patří mezi skupinu proteinů, které dokáží reverzibilně a specificky interagovat se sacharidy. Jedním z biologických následků této interakce je molekulární rozpoznání v rámci hostitelsko-patogenních interakcí. Bakteriální lektiny mohou působit jako virulentní faktory, které umožňují vazbu na povrchové sacharidy hostitelských buněk a tím iniciovat kolonizaci a infekci hostitele. Proto jsou v současné době některé bakteriální lektiny vnímány jako potenciální cíle nových antiadhesivních léčiv.

Diplomová práce se zabývá strukturně-funkční charakterizací lektinů z bakterie *Photorhabdus luminescens*, přičemž navazuje na bakalářskou práci Klonování lektinů z *Photorhabdus* spp. Nedávno byl charakterizován nový lektin PLL z *P. luminescens*. Po bioinformatické analýze byly objeveny čtyři hypotetické proteiny s vysokou sekvenční homologií k lektinu PLL, jejichž vlastnosti a funkce jsou zatím nejasné.

V práci se věnujeme dvěma proteinům. První část je věnována charakterizaci lektinu PLU34, která tvoří jádro práce. Druhá část je věnována lektinu PLU35. Práce je založena na metodách proteinové biochemie zahrnujících proteinovou purifikaci, krystalizaci, charakterizaci oligomerného stavu a vazebné specifity daných lektinů s využitím biofyzikálních metod jako je analytická ultracentrifugace, isotermální titrační kalorimetrie a rezonance povrchového plasmonu.

Abstrakt

Lektíny patria medzi skupinu proteínov, ktoré dokážu reverzibilne a špecificky interagovať so sacharidmi. Jedným z biologických následkov tejto interakcie je molekulárne rozpoznanie v rámci hostiteľsko-patogénnych interakcií. Bakteriálne lektíny môžu pôsobiť ako virulentné faktory, ktoré umožňujú väzbu na povrchové sacharidy hostiteľských buniek a tým iniciovať kolonizáciu a infekciu hostiteľa. Preto sú v súčasnej dobe niektoré bakteriálne lektíny vnímané ako potenciálne ciele nových antiadhezívnych liečiv.

Diplomová práca sa zaoberá štruktúrne-funkčnou charakterizáciou lektínov z baktérie *Photorhabdus luminescens*, pričom nadväzuje na bakalársku prácu Klonování lektinů z *Photorhabdus* spp. Nedávno bol charakterizovaný nový lektín PLL z *P. luminescens*. Po bioinformatickej analýze boli objavené štyri hypotetické proteíny s vysokou sekvenčnou homológiou k lektínu PLL, ktorých vlastnosti a funkcie sú zatiaľ nejasné.

V práci sa venujeme dvom proteínom. Prvá časť je venovaná charakterizácii lektínu PLU34, ktorá tvorí jadro práce. Druhá časť je venovaná lektínu PLU35. Práca je založená na metódach proteínovej biochémie zahrňujúcich proteínovú purifikáciu, kryštalizáciu, charakterizáciu oligomérneho stavu a väzbovej špecifity daných lektínov s využitím biofyzikálnych metód ako je analytická ultracentrifugácia, izotermálna titračná kalorimetria a rezonancia povrchového plazmónu.

Abstrakt

Lectins belong to the group of proteins that specifically and reversibly bind carbohydrates. One of the biological consequences of this interaction is a molecular recognition in host-pathogen interactions. Bacterial lectins may function as virulent factors that enable bacteria to bind surface glycans on the host cells and initiate colonization and host infection. This is one of the reasons why some of the bacterial lectins are currently viewed as potential targets for anti-adhesion therapy.

The Master's thesis is focused on the structural and functional characterization of lectins from *Photorhabdus luminescens* bacteria and builds on a previous work published in the Bachelor's thesis Cloning of lectins from *Photorhabdus* spp. A novel PLL lectin from *P. luminescens* has been characterized recently. After bioinformatics analysis, we found four hypothetical proteins with high sequence homologies to the PLL lectin. Their functions and properties have yet to be characterized.

The thesis deals with two proteins. The first part is focused on the PLU34 lectin characterization that represents the core of the thesis. The second part is focused on the PLU35 lectin. The work is based on the protein biochemistry techniques including protein purification, crystallization, determination of protein oligomerization state and characterization of the binding specificities using biophysical methods such as analytical ultracentrifugation, isothermal titration calorimetry and surface plasmon resonance.



MASARYKOVA UNIVERZITA

Přírodovědecká fakulta

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Akademický rok: 2016/2017

Ústav: Ústav biochemie

Student: Bc. Lukáš Gajdoš

Program: Biochemie

Obor: Analytická biochemie

Ředitel Ústavu biochemie PŘF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s názvem:

Název práce: Příprava a charakterizace lektinů z bakterie *Photobacterium luminescens*

Název práce anglicky: Preparation and characterization of lectins from bacterium *Photobacterium luminescens*

Oficiální zadání:

Lektiny jsou proteiny nebo glykoproteiny neimunitního původu schopné rozpoznávat a reverzibilně vázat sacharidové struktury. Účastní se celé řady fyziologických i patologických procesů u virů, bakterií, rostlin, hub a živočichů. Lektiny patogenních mikroorganismů hrají důležitou roli při složitých interakcích mezi patogeny a hostitelskými buňkami. Bakterie *Photobacterium luminescens*, žijící v symbiotickém vztahu s hlístovkami rodu *Heterorhabditis*, je vysoce patogenní pro široké spektrum hmyzu. Hlístovky infikují larvy hmyzu a poté uvolní do hemocoelu bakterie. Usmrcený hmyzí jedinec poté slouží jako zdroj živin pro nově se vyvíjející hlístovky. Diplomová práce navazuje na výsledky bakalářské práce, která se zabývala klonováním hypotetických lektinů z patogenu *P. luminescens*. Připravené konstrukty budou dále použity pro expresi, purifikaci a následnou charakterizaci proteinů. V případě úspěšné přípravy rekombinantních proteinů se tak student seznámí s řadou pokročilých technik vhodných pro funkční i strukturní charakteristiku lektinů.

Jazyk závěrečné práce: slovenština

Vedoucí práce: prof. RNDr. Michaela Wimmerová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Petra Sýkorová

Datum zadání práce: 19. 11. 2014

V Brně dne: 3. 1. 2017

Souhlasím se zadáním (podpis, datum):

Bc. Lukáš Gajdoš
student

prof. RNDr. Michaela Wimmerová, Ph.D.
vedoucí práce

doc. RNDr. Oldřich Janiczek, CSc.
zástupce ředitele Ústavu biochemie
pro pedagogické záležitosti

Pod'akovanie

Chcel by som sa pod'akovať pani prof. RNDr. Michaele Wimmerovej, Ph.D. za odborné vedenie a pomoc s vybavením zahraničnej stáže, ktorá pravdepodobne ovplyvní moju blízku aj vzdialenú budúcnosť. Mojej konzultantke Evči za čas, ochotu a trpezlivosť s mojimi všetečnými otázkami a pomocou pri akomkoľvek probléme. Celej skupine Glykobiochémie, menovite Lenke, Jitke, Pepovi a Honzovi, za pomoc pri experimentoch a hodnotení výsledkov. Neposledné ďakujem patrí rodičom, ktorých morálne a finančné zázemie mi dovolili vyštudovať tak fascinujúci a náročný odbor bez vážnejšej psychickej ujmy.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som svoju diplomovú prácu vypracoval samostatne s využitím informačných zdrojov, ktoré sú v práci citované.

Brno 15.5.2017

.....

Lukáš Gajdoš

OBSAH

ZOZNAM SKRATIEK	13
TEORETICKÁ ČASŤ	15
1 <i>Photorhabdus luminescens</i>	15
1.1 Charakteristika	15
1.2 Symbióza s hlístovcami.....	16
1.3 Transmisia baktérie hlístovcom <i>H. bacteriophora</i>	18
1.4 Patogenita baktérie	20
1.5 Využitie <i>P. luminescens</i>	21
2 Lektíny	22
2.1 Charakteristika a vlastnosti.....	22
2.2 Bakteriálne lektíny	23
2.2.1 Lektíny zapojené do hostiteľsko-patogénnych interakcií.....	25
2.3 Antiadhezívna terapia.....	26
2.4 Lektín PLL z <i>Photorhabdus luminescens</i>	27
CIELE PRÁCE	29
PRAKTICKÁ ČASŤ	30
3 Materiály a metódy	30
3.1 Kultivácia buniek	30
3.2 Expresia rekombinantných proteínov	30
3.3 Príprava vzorky pre purifikáciu.....	31
3.4 Purifikácia rekombinantných proteínov	31
3.5 SDS-PAGE elektroforéza	32
3.6 Vsádková metóda	33
3.7 Dialýza	34
3.8 Koncentrovanie proteínu	34

3.9	Analytická ultracentrifugácia	34
3.10	Izotermálna titračná kalorimetria.....	35
3.11	Rezonancia povrchového plazmónu	35
3.11.1	Testy priamej väzby	35
3.11.2	Inhibičné testy	36
3.12	Aglutinačné testy	36
3.12.1	Hemaglutinácia	36
3.12.2	Aglutinácia kvasiniek.....	36
3.13	Proteínová kryštalizácia.....	37
VÝSLEDKY A DISKUSIA.....		39
4	PLU34.....	39
4.1	Zisťovanie väzbových vlastností vsádkovou metódou	39
4.2	Expresia a purifikácia proteínu PLU34	40
4.3	Analýza oligomérneho stavu proteínu	43
4.4	Termodynamika interakcie lektínu so sacharidmi	44
4.5	Meranie väzbovej špecificity metódou SPR.....	47
4.6	Kryštalizácia proteínu PLU34	50
4.7	Aglutinačné testy	53
4.7.1	Hemaglutinácia	53
4.7.2	Aglutinácia kvasiniek	54
5	PLU35.....	57
5.1	Zisťovanie väzbových vlastností vsádkovou metódou	57
5.2	Purifikácia lektínu PLU35	58
ZÁVER.....		60
SUMMARY.....		61
LITERATÚRA		62

ZOZNAM SKRATIEK

AAL	lektín z <i>Aleuria aurantia</i>
AFL	lektín z <i>Aspergillus fumigatus</i>
AMP	antimikrobiálne peptidy
APS	persíran amónny
AUC	analytická ultracentrifugácia
BC2L	lektín z <i>Burkholderia cenocepacia</i>
CI	nerozpustná frakcia bunkového lyzátu (cytoplasmic insoluble)
CS	rozpustná frakcia bunkového lyzátu (cytoplasmic soluble)
EPN	entomopatogénne hlístovce (entomopathogenic nematodes)
HEPES	2-[4-(2-hydroxyetyl)piperazín-1-y]etánsulfonová kyselina
IC ₅₀	inhibičná koncentrácia, pri ktorej dochádza k 50% inhibícii
IJ	infekčný jedinec
IPTG	izopropyl- β -D-tiogalaktopyranozid
ITC	izotermálna titračná kalorimetria
LB	Luria-Bertani médium
LecA	Lektín A z <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA-IL)
LecB	Lektín B z <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA-IIL)
NaAc	octan sodný (sodium acetate)
OD ₆₀₀	optická hustota meraná pri vlnovej dĺžke 600 nm
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAMP	s patogénom asociované molekuly (pathogen-associated molecular pattern)
PBS	fosfátový pufer (phosphate buffered saline)
PEG	polyetylén glykol
PLL	lektín z <i>Photorhabdus luminescens</i>
PO	fenoloxidáza (phenoloxidase)
RSL	lektín z <i>Ralstonia solanacearum</i>
RU	relatívna odozva (relative unit)

SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovom géli v prítomnosti SDS
Spp	druhy (species)
SPR	rezonancia povrchového plazmónu (surface plasmon resonance)
ST	stilbén
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametyletyléndiamín
Tris	tris(hydroxymetyl)aminoetán
TTSS	sekrečný systém III. typu (type three secretion system)

TEORETICKÁ ČASŤ

1 *Photorhabdus luminescens*

1.1 Charakteristika

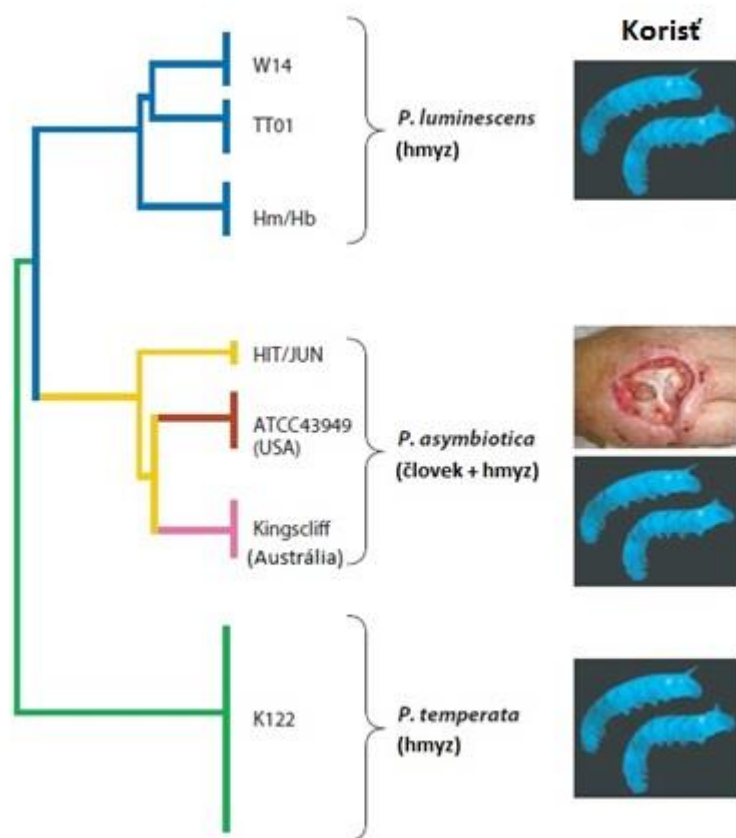
Baktérie rodu *Photorhabdus* patria medzi gram-negatívne γ -proteobaktérie čeľade *Enterobacteriaceae*, tvoriace entomopatogénne symbiózy s pôdnymi hlístovcami (1). Prvá zmienka o luminescentných baktériách rodu *Photorhabdus* pochádza pravdepodobne z 19. storočia, kedy si vojenský lekárí všimli svetielkujúce rany u vojakov. Lekári tento signál považovali za dobrý znak, keďže sa rany rýchlo hojili. Vo svetle dnešných poznatkov sa má za to, že antibiotiká produkujúce baktériou pomohli inhibovať rast infekčných baktérií (2). Prvé izoláty baktérie pochádzajú z roku 1977, pričom boli charakterizované bioluminiscenciou a symbiotickou asociáciou s entomopatogénnymi hlístovcami *Heterorhabditis bacteriophora*. Tieto izoláty boli klasifikované ako *Xenorhabdus luminescens*. Na základe analýz DNA príbuznosti a fenotypových odlišností medzi *X. luminescens* a ostatnými druhmi *Xenorhabdus*, bol v roku 1993 navrhnutý nový rod *Photorhabdus*, *Photorhabdus luminescens*. Ďalšie analýzy DNA, spolu s ΔT_m meraniami a fenotypovými testami, viedli k navrhnutiu dvoch nových druhov: *Photorhabdus temperata* a *Photorhabdus asymbiotica* (**Obrázok 1**) (3–5).

Baktérie sa vyvíjajú a žijú v kompletne biotopickom prostredí. *Photorhabdus* kolonizuje črevá infekčných mláďat hlístovcov rodu *Heterorhabditis*, žijúcich v pôde, ktoré aktívne vyhľadávajú larvy hmyzu, ktoré napadnú a s pomocou symbionta usmrčia. Voľne žijúce baktérie neboli izolované z pôdy ani vodných zdrojov, čo naznačuje, že symbiotický vzťah s hlístovcami je esenciálny pre prežitie baktérie v pôdnom prostredí. Zatiaľ čo *P. luminescens* s *P. temperata* patria medzi patogénov hmyzu, *P. asymbiotica* bol pôvodne izolovaný len z klinických vzoriek pacientov a predstavuje ľudský patogén spôsobujúci infekcie mäkkých tkanív zaznamenané po vonkajšej aktivite v piesku či pôde za teplých letných dní. Nedávno bol však objavený aj jeho hlístovcový vektor, ktorý dokáže rovnako infikovať aj hmyz (1, 6, 7).

Photorhabdus sú vysoko pohyblivé, bioluminiscentné a fakultatívne-anaeróbne tyčinkovité baktérie. Môžu byť kultivované ako voľné organizmy za štandardných laboratórnych podmienok. Zaujímavou vlastnosťou je tvorba fenotypových variantov, tzv. buniek fázy I a fázy II. Po dlhšej kultivácii v nutrične-limitovanom médiu vzniká generácia buniek fázy II, ktoré sú stále patogénne pre hmyz ale nepodporujú symbiózu s hlístovcom.

Baktérie fázy I predstavujú prirodzeného symbionta izolovaného z entomopatogénnych nematód (2, 8).

Photorhabdus luminescens podstupuje zložitý životný cyklus, ktorý zahŕňa symbiotické štádium, v ktorom je baktéria prenášaná v čreve hlístovca a patogénne štádium, v ktorom je hmyzia korisť zabitá baktériou a hlístovcom (1).



Obrázok 1: Schematický opis fylogénie rodu *Photorhabdus*. Jednotlivé kmene troch druhov baktérie sú rozdelené do subtypov. *P. asymbiotica* obsahuje najmenej 2 subtypy, izolované z USA a Austrálie. Tretí subtyp reprezentujúci HIT a JUN izoláty z kontinentálnej Európy potvrdzuje, že tieto genotypické formy nie sú obmedzené na dva kontinenty. Prevzaté z (5) a upravené.

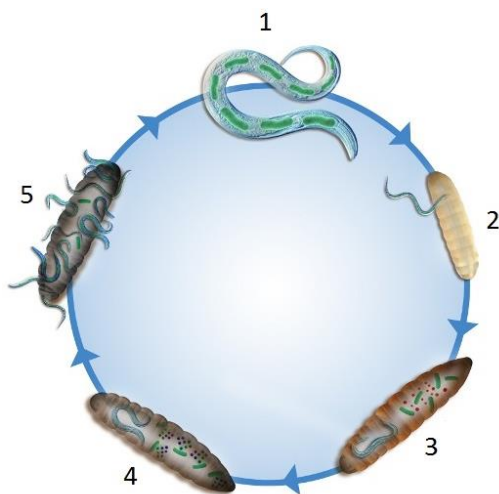
1.2 Symbióza s hlístovcami

Hlístovce patria medzi najrozšírenejšie a najrozmanitejšie živočíchy na svete. Zahrňujú približne jeden milión druhov a počtom predstavujú viac ako 80 % všetkých živočíchov (9). Parazitické hlístovce spôsobujú mnohé vážne ochorenia u ľudí, ako napríklad onchocerkózu (riečna slepota) či lymfatickú filariázu (elefantiáza) (10). Napriek svojej nemilej reputácii majú parazitické hlístovce aj mnohé pozitívne vplyvy na ľudské záujmy či zdravie. Entomopatogénne nematódy (EPN) rodu *Steinernema* a *Heterorhabditis* sú komerčne

využívané ako prostriedky biologickej ochrany proti hmyzím škodcom. V priebehu evolúcie si EPN vytvorili mutualistické asociácie s baktériami rodu *Xenorhabdus* a *Photorhabdus*, ktoré im pomáhajú zabiť hmyz a využiť zdochlinu ako zdroj potravy a miesto vývoja nových hlístovcov (11).

P. luminescens prebýva v čreve infekčného štádia hlístovca *Heterorhabditis bacteriophora*, ktorý v pôde aktívne vyhľadáva hmyziu korisť (**Obrázok 2**). Následne hlístovec preniká do larvy hmyzu priamo alebo cez prirodzené otvory a vydávi 50-200 bakteriálnych buniek do obehového systému hmyzu. Baktérie sú schopné prekonať imunitnú reakciu hmyzu a navodiť letálnu toxikémiu a septikémiu. Po smrti larvy sa baktéria množí za súčasného rozkladu tela zdochliny. Hlístovec sa živí baktériami, pričom vývoj nových jedincov prechádza niekoľkými generáciami. Po približne 14 dňoch od infekcie opúšťa zdochlinu viac ako 400 000 nových infekčných jedincov pripravených nájsť novú korisť (5).

Väčšina interakcií medzi baktériou a hostiteľom zahŕňa určitý stupeň metabolickej interakcie. Zdá sa, že vo voľnej prírode je interakcia *Photorhabdus-Heterorhabditis* nevyhnutná. *Photorhabdus* poskytuje svojmu hostiteľovi výživu a je vyžadovaný pre rast a vývin hlístovca. V *in vitro* experimentoch však hlístovec dokáže rásť len na špecifických kmeňoch baktérie a navyše bakteriálna kultúra nie je dostatočná pre jeho vývin. Okrem živých baktérií je hostiteľ závislý aj na faktoroch prítomných v larve hmyzu (5, 12).



Obrázok 2: Životný cyklus hlístovca *Heterorhabditis bacteriophora* a baktérie *P. luminescens*. Krok 1: *P. luminescens* symbioticky kolonizuje črevo hlístovca. Krok 2: Nematóda žije v pôde, kde aktívne vyhľadáva hmyziu korisť, ktorú napadne. Krok 3: Hlístovec uvoľňuje baktérie, ktoré produkujú toxíny spôsobujúce smrť larvy. Krok 4: *Photorhabdus* chráni hmyzí kadáver pred saprofytickými organizmami produkciou antibiotík. Krok 5: Vnútri materskej nematódy prebieha vývin nových jedincov, ktoré opúšťajú zdochlinu. Prevzaté z (13) a upravené.

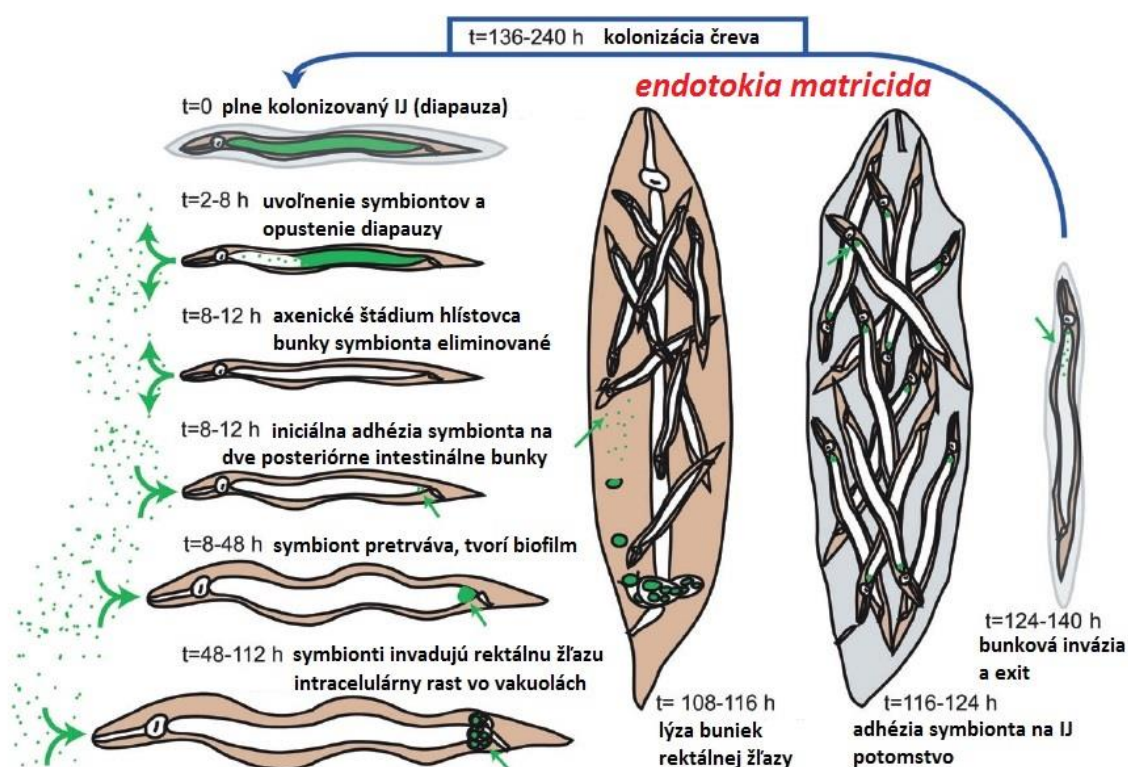
1.3 Transmisia baktérie hlístovcom *H. bacteriophora*

Životný cyklus *P. luminescens* je pozoruhodne zložitý proces. Baktéria je prenášaná vývojovo-pozastaveným tretím larválnym štádiom hlístovca (IJ), ktorého črevo je kolonizované bunkami symbionta. Prenos baktérie do novej generácie IJ je nevyhnutný pre oboch partnerov, nakoľko hlístovce zbavené svojho symbionta nie sú schopné zabiť svoju korisť ani sa efektívne reprodukovať (14, 15).

Transmisia začína po vstupe IJ do hemocoelu (otvorený krvný obeh hmyzu) koristi cez prirodzené otvory (ústa, anus) alebo penetrovaním kutikuly. Všetky symbiotické bunky sú následne uvoľnené do hemolymfy hmyzu. IJ po vydávení symbionta opúšťa diapauzu a pokračuje vo vývine (**Obrázok 3**). *H. bacteriophora* je bakterivor, podobne ako *C. elegans*, a živí sa množiacimi sa baktériami, ktoré predstavujú jeho primárny zdroj potravy. Pár týchto strávených buniek adhezuje na posteriórne črevo hlístovca, kde tvoria biofilm. Po viac ako 36 hodinách baktérie napadnú bunky rektálnej žľazy, kde sa rozmnožujú vnútri membránovo uzavretých vakuol. Medzitým sa v telesnej dutine dospelého hermafroditického hlístovca liahne nové potomstvo infekčných jedincov v procese zvanom *endotokia matricida*. Tento typ rozmnožovania vnútromaternicovým liahnutím je jediným spôsobom vzniku IJ schopných infikovať hmyz. Po lýze rektálnych buniek sú baktérie uvoľnené z vakuol do telesnej dutiny, pričom črevo hlístovca zostáva neporušené. Každý vyvíjajúci sa IJ je infikovaný jednou bunkou symbionta, ktorá adhezuje na bunky medzi hltanom a črevom, kde sa množí. Následne baktérie opúšťajú toto miesto a postupne kolonizujú celé črevo IJ, kde zostávajú v semidormantnom stave, kým nie je nájdená nová hmyzia korisť (16).

Prvým krokom vo vývine IJ do dospelého hermafroditického hlístovca je fáza zvaná *recovery*. Táto je v hmyze normálne stimulovaná necharakterizovanými molekulami prítomnými v hemolymfe. Infekčné jedince podstupujú *recovery* aj pri *in vitro* kultivácii na miskách s *Photorhabdus*, naznačujúc, že baktéria produkuje určitý signál, ktorý stimuluje vývin hlístovca. Ako dôležitý komponent tohto signálu bol identifikovaný stilbén, hlavný sekundárny metabolit *Photorhabdus*. Stilbén je polyketidová molekula produkovaná zväčša rastlinami, pričom *Photorhabdus* je jediný známy nerastlinný organizmus schopný jeho produkcie. Napriek tomu, že je vyžadovaný pre IJ *recovery*, musia byť prítomné aj živé bunky baktérie. Stilbén je multipotentná molekula, ktorá funguje aj ako antibiotikum a inhibítor imunitného systému hmyzu, čo potvrdzuje jej kľúčovú úlohu v zložitých vzťahoch mutualizmu a patogenity medzi baktériou, hlístovcom a hmyzom (17, 18).

Transmisia *Photorhabdus* predstavuje prepracovaný sled krokov zahrňujúci bunkovo-špecifickú infekciu materského hlístovca a jeho potomstva. Mnohé udalosti sú spoločné pri patogénoch spôsobujúcich vážne ochorenia (adhézia/invázia). *Photorhabdus* pravdepodobne využíva efektorové molekuly pre adhéziu, inváziu a intracelulárny rast, podobné virulentným faktorom u patogénov. Identifikácia týchto a ostatných faktorov pre transmisiu a patogenézu by pomohla lepšie pochopiť procesy prebiehajúce pri mutualizme a infekčných ochoreniach (5).



Obrázok 3: Proces transmisie *Photorhabdus luminescens* hlístovcom rodu *Heterorhabditis*. Transmisia symbionta normálne začína u vývinovo pozastaveného IJ, ktorého črevný lúmen kolonizujú bunky baktérie (zelená). Po vycítaní neznámeho signálu v hemolymfe hmyzu, IJ opúšťa diapauzu a vydávi všetky bunky symbionta do hemolymfy. Hlístovec následne požíra symbiotické baktérie, z ktorých pár adheruje a pretrváva na posteriórnom čreve a tvorí biofilm. Neskôr tieto bunky invadujú bunky rektálnej žľazy a rastú vnútri vakuol. Infekčné jedince sa vyvíjajú v telesnej dutine materského hlístovca v procese zvanom *endotokia matricida*. Rektálne bunky lyzujú, čím uvoľnia symbiotické baktérie a sprístupnia ich vyvíjajúcim sa IJ. Bakteriálne bunky následne adherujú na faryngálno-intestinálne chlopňové bunky infekčných jedincov, ktoré neskôr opúšťajú a kolonizujú črevný lúmen IJ. Prevzaté z (19) a upravené.

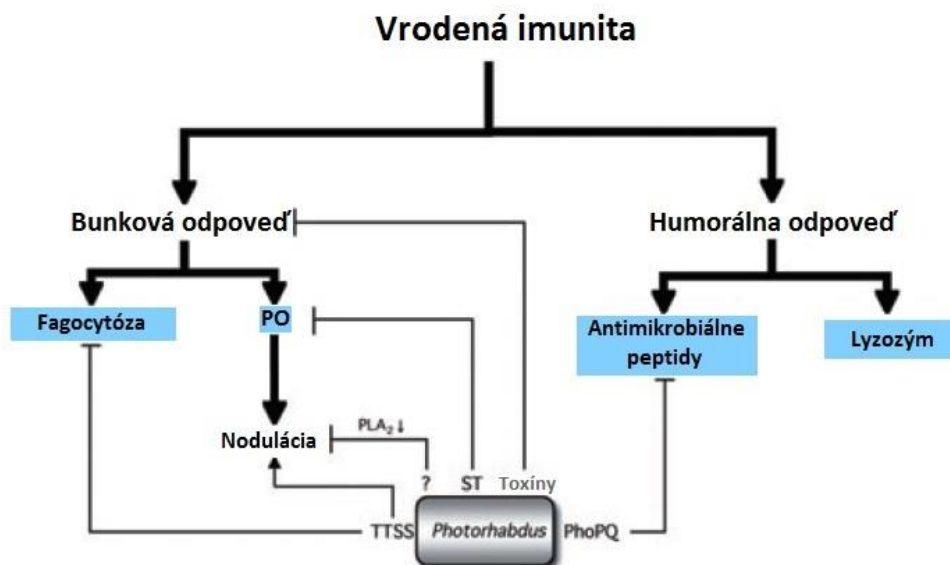
1.4 Patogenita baktérie

Photorhabdus je vysoko virulentný patogén širokej škály hmyzu. Na zabitie koristi stačí 50-200 buniek baktérie, čo naznačuje vysokú virulenciu a schopnosť odolávať imunitným odpovediam hmyzu s rôznym genetickým pozadím. Tieto požiadavky sa odrážajú v genóme *PITTT01*, u ktorého bolo predikovaných viac génov pre toxíny, ako v ktoromkoľvek dovtedy osekvenovanom bakteriálnom genóme. Okrem toho kóduje veľký počet adhezínov, hemolýzínov, proteáz, lipáz a antibiotík (5, 20).

Po uvoľnení *Photorhabdus* do hemocoelu musí baktéria čeliť imunitným faktorom bunkovej a humorálnej odpovede (**Obrázok 4**). Bunková reakcia je mediovaná cirkulujúcimi hemocyty a zahŕňa fagocytózu a noduláciu, pri ktorej hemocyty agregujú okolo mikroorganizmov a tvoria noduly. Tie sú následne melanizované prostredníctvom enzýmu fenoloxidázy (PO), ktorý vzniká štiepením neaktívneho proenzýmu v kaskáde serínových proteáz po rozpoznaní tzv. PAMP, s patogénom asociovaných molekúl, na povrchu mikroorganizmu (21).

Photorhabdus sa v larve hmyzu množí priamo v hemolymfe a okrem toho kolonizuje špeciálne miesto medzi extracelulárnou matrix a bazálnou membránou črevného epitelu. Tu produkuje celý rad toxínov zahrňujúcich Tc a Mcf toxíny, ktoré indukujú apoptózu imunitných buniek hmyzu. Ako mnoho patogénnych gram-negatívnych baktérií, aj *Photorhabdus* kóduje sekrečný systém III. typu (TTSS), ktorý secernuje najmenej jeden efektorový proteín LopT do hemocytov a inhibuje tak fagocytózu. Navyše baktéria produkuje zlúčeniny, ktoré inhibujú hmyziu fosfolipázu A2, enzým zapojený do aktivácie bunkovej imunity (12, 22–24).

Humorálna vrodená imunitná odpoveď zahŕňa predovšetkým produkciu širokého spektra antimikrobiálnych peptidov (AMP) a lyzozýmu. *Photorhabdus* je rozpoznávaný receptormi molekulových vzorov, čo vedie k zvýšenej produkcii špecifických AMP. Zaujímavé je, že *Photorhabdus* nedokáže infikovať hmyz, ktorý bol pre-imunizovaný *E.coli* a ktorý tak má vysoké hladiny cirkulujúcich AMP. Baktéria nie je prirodzene rezistentná voči humorálnej imunite a musí sa na ňu adaptovať remodeláciou vonkajšej membrány, predovšetkým lipopolysacharidov. To vedie k zmene povrchového náboja baktérie a tým k zvýšeniu rezistencie voči nabitým AMP (25–27).



Obrázok 4: Počas infekcie *Photorhabdus* produkuje faktory, ktoré ovplyvňujú bunkovú aj humorálnu imunitnú odpoveď hmyzu. Baktéria je rozpoznaná imunitným systémom hmyzu a na humorálnu odpoveď sa adaptuje zvýšením aktivity dvoj-komponentného systému PhoPQ (systém kinázy PhoP a regulačného proteínu PhoQ regulujúci transkripciu génov), čo vedie k modifikácii povrchových lipopolysacharidov. *Photorhabdus* produkuje celú škálu toxínov, ktoré zabíjajú imunitné bunky hmyzu a zároveň produkuje zlúčeniny inhibujúce hmyziu fosfolipázu PLA₂ a noduláciu. Navyše sekrečný systém III. typu secernuje efektorové molekuly, ktoré inhibujú fagocytózu, ale indukujú formovanie nodúl, dôležitej bunkovej odpovede na infekciu. Malá bioaktívna molekula stilbén inhibuje fenoloxidázu, enzým zapojený v syntéze melanínu, ktorý stabilizuje noduly. Prevzaté z (12) a upravené.

1.5 Využitie *P. luminescens*

Entomopatogénne komplexy hlístovcov rodu *Heterorhabditis* a baktérie *P. luminescens* sú roky využívané ako biologické prostriedky ochrany plodín proti hmyzím škodcom. Pokroky v masovej produkcii a príprave EPN rovnako ako túžba po redukcii chemických pesticídov viedli k zvýšenému komerčnému využitiu a vývoju EPN. Medzi hlavné výhody patrí efektívnosť, schopnosť samoobnovy, pretrvania v pôde a bezpečnosť pre používateľa i prostredie (28, 29). Sekvenácia genómu *P. luminescens* viedla k zisteniu, že viac ako 6 % celkového genómu predstavujú gény kódujúce enzýmy zapojené do biosyntézy sekundárnych metabolitov. Toto percento je vyššie ako u gram-pozitívnych baktérií rodu *Streptomyces*, ktoré predstavujú hlavných producentov sekundárnych metabolitov a zdroj viac ako 80 % klinicky dôležitých antibiotík. To robí z *Photorhabdus* potenciálneho producenta bioaktívnych molekúl (30, 31).

2 Lektíny

2.1 Charakteristika a vlastnosti

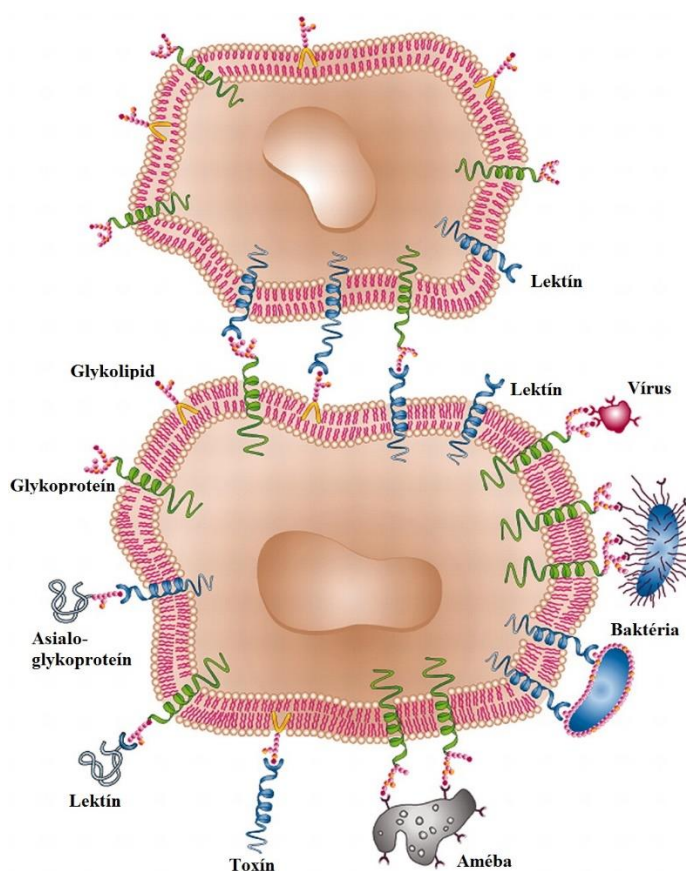
Lektíny predstavujú širokú skupinu proteínov, ktoré špecificky a reverzibilne interagujú so sacharidmi. Nemajú katalytickú aktivitu a na rozdiel od protilátok nie sú imunitného pôvodu. Lektíny majú často dve a viac väzbových miest, čo im umožňuje aglutinovať bunky, ktoré na svojom povrchu exprimujú sacharidové štruktúry. Tento fenomén stál za objavom samotných lektínov v 19. storočí, kedy Hermann Stillmark a Robert Kobert prvýkrát pozorovali ako extrakt z fazúľ ricínu obyčajného (*Ricinus communis*) aglutinoval erytrocyty. Tieto proteíny v tom čase nazývali hemagglutíniny, resp. fytohemagglutíniny, nakoľko boli izolované výhradne z rastlín. Samotný názov lektíny dostali až v 60. rokoch 20. storočia a vychádza z latinského *legere*, vybrať (32, 33).

Lektíny sa vyskytujú vo všetkých živých formách od rastlín, zvierat, húb až po baktérie a vírusy. Môžu byť triedené podľa pôvodu, molekulárnej štruktúry či špecifity k monosacharidom. Afinita k monosacharidom je zvyčajne pomerne nízka, s afinitami v milimolárnom rozmedzí. Napriek tomu sú veľmi selektívne, hlavne pre komplexnejšie sacharidy. Táto interakcia má dôležitejší význam, keďže oligosacharidy predstavujú ich najčastejšie prirodzené ligandy. Afinita k oligosacharidom môže variovať z dôvodu voľnej otáčavosti jednotlivých monosacharidov okolo glykozidovej väzby (34).

Väzbové miesta sa najčastejšie vyskytujú na povrchu proteínu vo forme plytkých priehlbín a zvyčajne dochádza len k malým konformačným zmenám po väzbe ligandu. Lektíny interagujú so sacharidmi prostredníctvom siete vodíkových mostíkov a hydrofóbných interakcií. Vodíkové väzby sú tvorené medzi hydroxylovými skupinami daného sacharidu a amínovými skupinami, hydroxylmi či atómami kyslíka proteínu. K celkovej sile väzby prispievajú aj početné slabé Van der Waalsove sily. V niektorých prípadoch hrajú dôležitú úlohu pri tvorbe väzby aj atómy kovu (napríklad Ca^{2+}) či molekuly vody (34).

Hlavná biologická funkcia lektínov spočíva pravdepodobne v bunkovom rozpoznaní (**Obrázok 5**). Idea je odvodená od známej hypotézy zámku a kľúča v prípade enzýmovej špecifity. Sacharidy môžu skrývať neobyčajný potenciál pre kódovanie informácií, vychádzajúci z rôzneho spôsobu vetvenia monosacharidov, prítomnosti troch a viac voľných hydroxylových skupín, či rôznej anomérie vetvenia (α/β). Z dvoch monosacharidov tak môže vzniknúť až 11 rôznych disacharidov. Funkcie lektínov sa rôznia aj v závislosti od pôvodu či miesta expresie. Bolo dokázané, že mikrobiálne lektíny sa zúčastňujú adhézie

mikroorganizmov na hostiteľské bunky a môžu mať cytolytickú aktivitu (35). Rastlinné lektíny patria medzi najväčšiu a najpreskúmanejšiu skupinu týchto proteínov. Ich presná úloha nie je celkom jasná, ale predpokladá sa, že sa zúčastňujú symbiotického vzťahu medzi baktériami fixujúcimi dusík a strukovinovými rastlinami. Iná hypotéza predpokladá všeobecnejšiu funkciu v obrane rastlín pred predátormi, ako sú bezstavovce či fytopatogénne huby (36). Živočíšne lektíny sa zúčastňujú mediácie endocytózy, regulácie bunkového rastu, degradácie a zbal'ovania glykoproteínov a fungujú tiež v imunitných odpovediach. Medzi známe podskupiny živočíšnych lektínov patria galektíny, selektíny či intelektíny (37).



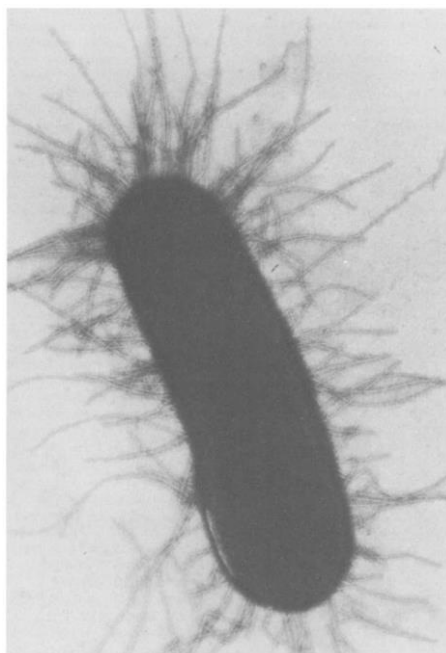
Obrázok 5: Znázornenie bunkového rozpoznania založeného na interakcii lektín-sacharid. Prevzaté z (32) a upravené.

2.2 Bakteriálne lektíny

Baktérie a ďalšie mikrobiálne organizmy exprimujú na svojom povrchu veľké množstvo lektínov (38). Prvé bakteriálne povrchové lektíny boli opísané v roku 1970 Nathanom Sharonom a jeho kolegami. Hlavnou funkciou týchto lektínov je prichytenie

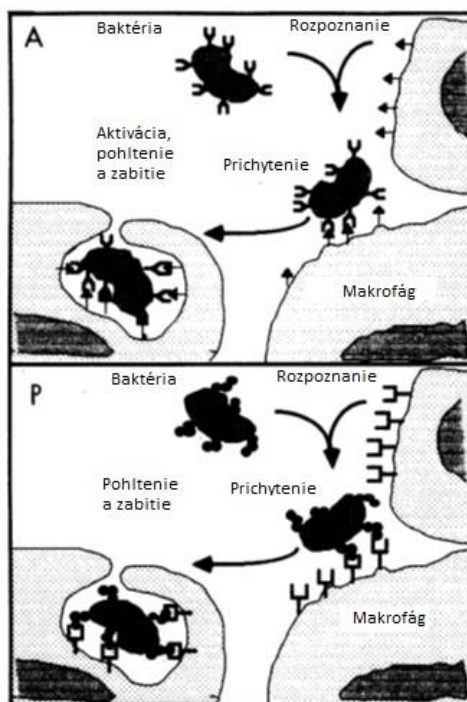
a adhézia baktérií na hostiteľské bunky, ako prerekvizita pre kolonizáciu a infekciu. Preto sa niektoré lektíny nazývajú adhezíny a glykánové ligandy na povrchu hostiteľských buniek receptory. Kolonizácia nemusí nutne znamenať patogénny stav, ako napríklad v prípade prospešných črevných baktérií, ktoré kolonizujú gastrointestinálny trakt (39).

Dobre preštudované bakteriálne lektíny sú napríklad manóza-špecifické lektíny baktérie *Escherichia coli*, ktoré sa vyskytujú na povrchu baktérie vo forme filamentóznych štruktúr, tzv. fimbrií, ktoré slúžia ako adhezívne organely (**Obrázok 6**). Fimbrie typu I exprimujú takmer všetky kmene *E. coli*. Sú rovnomerne distribuované, s priemernou dĺžkou 0,1 μm a hrúbkou približne 7 nm. V prípade urinálnych infekcií, spôsobených uropatogénnymi baktériami *E. coli*, dochádza k mediácii adhézie prostredníctvom fimbriálneho lektínu FimH, ktorý viaže manozidové reziduá uroepiteliálneho glykoproteínu uroplakínu Ia (38, 40).



Obrázok 6: Snímka elektrónového mikroskopu fimbrií tyu I baktérie *E. coli*. Prevzaté z (38) a upravené.

Okrem iniciácie infekcie môžu fimbriálne lektíny sprostredkovať špeciálny typ fagocytózy, tzv. lektinofagocytózu (**Obrázok 7**). Tá môže prebiehať v dvoch rôznych usporiadaniach. V prvom usporiadaní nesie baktéria na svojom povrchu lektíny, ktoré interagujú s komplementárnymi sacharidmi na povrchu fagocytujúcich buniek. V druhom sú lektíny súčasťou membrány fagocytov a viažu sa na povrchové sacharidy baktérií. Po molekulárnom rozpoznaní baktérie a fagocytu dochádza k prichyteniu, pohlteniu a zabitiu baktérie fagocytujúcim makrofágom (41, 42).



Obrázok 7: Znázornenie lektinofagocytózy sprostredkovanej povrchovými lektínmi baktérií, ktoré rozpoznávajú komplementárne sacharidy na povrchu fagocytov (A) a fagocytárnymi lektínmi, ktoré interagujú s bakteriálnymi sacharidovými reziduami (P). Lektín-sacharidové rozpoznanie medzi baktériou a fagocytom vedie k prichyteniu baktérie, jej pohlteniu a zabitiu fagocytujúcou bunkou. Prevzaté z (41) a upravené.

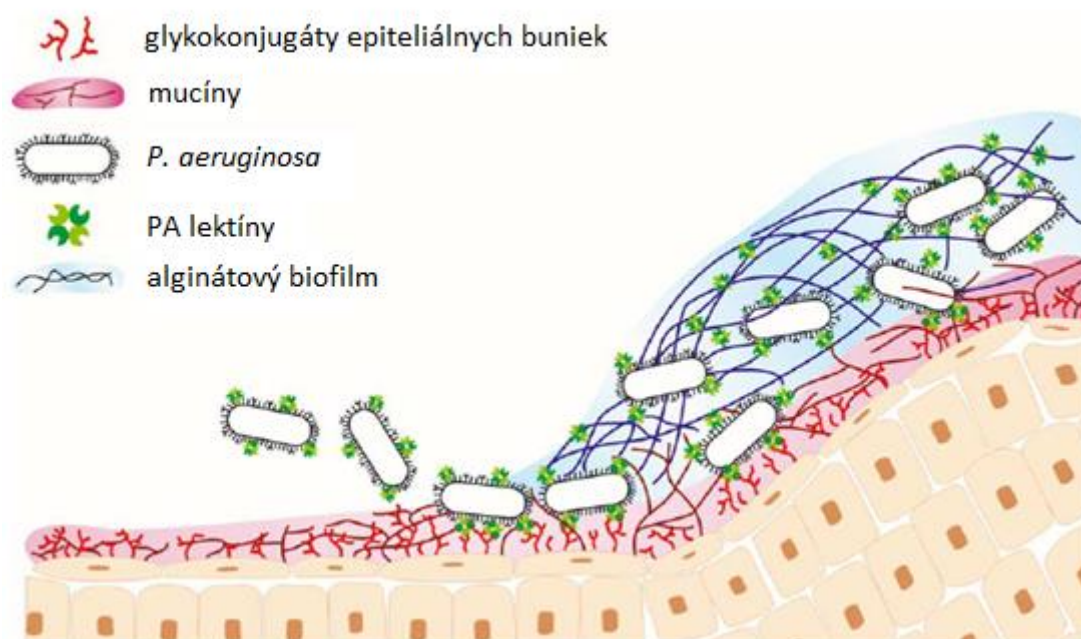
2.2.1 Lektíny zapojené do hostiteľsko-patogénnych interakcií

V súčasnosti sa veľká pozornosť v oblasti výskumu lektínov sústreďuje na lektíny z patogénnych organizmov, ktoré môžu byť cieľom novej generácie antimikrobiálnych liekov. Za posledné roky bolo opísaných niekoľko lektínov, ktoré môžu hrať úlohu v určitých fázach infekcie.

Aspergillus fumigatus je dôležitý alergén a oportunisticky patogénna pleseň. Spôsobuje alergické ochorenia a ochorenia dýchacích ciest u osôb s oslabenou imunitou. Nedávno opísaný lektín AFL z *A. fumigatus* vykazuje afinitu k L-fukóze a jej derivátom. Lektín je pravdepodobne prítomný na povrchu konídií a môže zabezpečovať väzbu na pľúcny epitel, prvú fázu infekcie. Okrem toho bola preukázaná stimulácia bronchiálnych buniek lektínom AFL, ktorá viedla k zvýšenej produkcii interleukínu-8. AFL tak môže pôsobiť ako faktor zodpovedný za prozápalový účinok *A. fumigatus* (43).

Ďalším významným oportunistickým patogénom je baktéria *Pseudomonas aeruginosa*, ktorá spôsobuje fatálne infekcie dýchacích ciest u pacientov s cystickou fibrózou. Baktéria má

mechanizmy, ktoré jej zabezpečujú rezistenciu k väčšine používaných antibiotík a predstavuje vážnu terapeutickú výzvu (44, 45). Baktéria produkuje dva lektíny, LecA špecifický k D-galaktóze a LecB špecifický k L-fukóze, ktoré patria medzi kľúčové virulentné faktory zodpovedné za adhéziu na hostiteľské bunky a tvorbu biofilmu (**Obrázok 8**). Oba lektíny sú v súčasnosti jednými z najštudovanejších cieľov nových antibakteriálnych terapeutík (46–48).



Obrázok 8: Schematické znázornenie možných úloh lektínov z *P. aeruginosa* v patogenéze baktérie. Lektíny LecA a LecB interagujú s povrchovými glykokonjugátmi a iniciujú adhéziu na epiteliálne bunky. Lektíny sa navyše zúčastňujú tvorby biofilmu. Prevzaté z (49) a upravené.

2.3 Antiadhezívna terapia

Bakteriálne infekcie patria medzi hlavné príčiny morbidity a mortality na svete. S rastúcou rezistenciou baktérií k antibiotikám rastie potreba vývoja nových alternatívnych spôsobov prevencie a liečby bakteriálnych infekcií. Prerekvizitou samotnej infekcie je adhézia patogénu na hostiteľské bunky, ktorá bráni organizmu zbaviť sa patogénov prirodzenými čistiacimi mechanizmami respiračného či urinálneho traktu. Povrchové lektíny mnohých baktérií patria medzi molekuly, ktoré umožňujú adhéziu a kolonizáciu hostiteľských tkanív. Zablokovanie tejto interakcie vhodnými sacharidmi či ich analógmi je cieľom antiadhezívnej terapie mikrobiálnych ochorení (50–52).

Z lekárskeho hľadiska sa zdá byť tento typ intervencie jemnejší a bezpečnejší v porovnaní s ostatnými typmi terapií. Je málo pravdepodobné, že by boli sacharidy toxické či

imunogénne, nakoľko sú prirodzenou súčasťou ľudských buniek či materského mlieka. Keďže antiadhezívne liečivá nezabíjajú patogény ani nebránia ich rastu, riziko vzniku rezistentných kmeňov je menšie ako v prípade antibiotík. Na druhú stranu, mnohé patogény exprimujú viac typov adhezínov, čo si vyžaduje pripraviť viaceré špecifické inhibítory (50).

V posledných rokoch došlo k posunu vo vývoji antiadhezívnych liekov, cielených prevažne na prevenciu a liečbu infekcií urogenitálneho traktu spôsobených uropatogénnymi *E. coli*. Lektín FimH, tvoriaci koncovú podjednotku fimbrií typu I, rozpoznáva manozylované uroplakíny a *N*-viazané oligosacharidy na luminálnom povrchu močového mechúra. Pri prvotných *in vivo* testoch na myších modeloch boli použité manózové analógy, ktoré preukázali slabú inhibíciu adhézie. Pre zvýšenie účinnosti inhibítorov sa uplatňujú dve stratégie, vývoj multivalentných zlúčenín so zvýšenou väzbovou aviditou a dizajn monovalentných inhibítorov s aglukánovou zložkou pre zvýšenie afinity. Najnovšia generácia FimH inhibítorov sú bifenylové manozidy, ktoré sú približne 200 000-krát účinnejšie ako manóza. Sú dostupné orálne, majú nízku cytotoxicitu a pri myších modeloch bolo preukázané zníženie bakteriálnej kolonizácie na úroveň podobnej tej, ako pri požití antibiotika ciprofloxacínu, čo z nich robí vážnych kandidátov na funkčné liečivá (53–57).

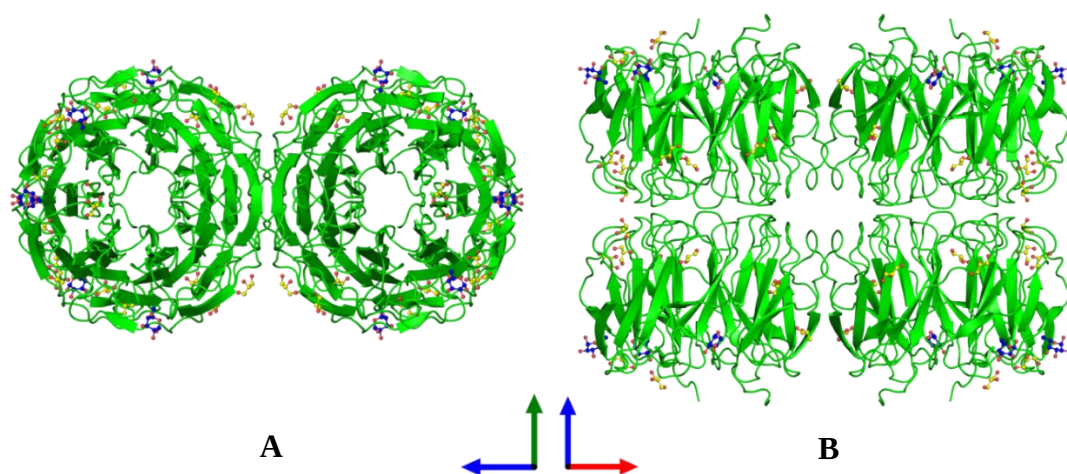
2.4 Lektín PLL z *Photorhabdus luminescens*

Nedávno bol charakterizovaný nový fukóza-špecifický lektín PLL z *P. luminescens*. Nakoľko *P. luminescens* je symbiont hlístovca a zároveň bakteriálny patogén, musí mať mechanizmy, ktoré mu zabezpečia rozpoznanie hostiteľom a interakciu s imunitným systémom hmyzu.

Lektín PLL vykazuje afinitu k α -fukóze s disociačnou konštantou 5,4 mM zistenou izotermálnou titračnou kalorimetriou. Okrem α -fukózy bola preukázaná interakcia s metyl- α -fukozidom a chitínovými oligosacharidmi. Lektín tvorí homotetramér s molekulovou hmotnosťou približne 164 kDa. Röntgenovou kryštalografiou bola vyriešená štruktúra natívneho a rekombinantného proteínu aj v komplexe s α -fukózou (**Obrázok 9**). Monoména jednotka má štruktúru 7-lopatkového β -propelleru, naznačujúc sedem potenciálnych väzbových miest pre fukózu. V procese tetramerizácie hrajú dôležitú úlohu dva disulfidické mostíky (58).

Biologická úloha lektínu PLL nie je celkom jasná. Niektoré experimenty potvrdili väzbu lektínu na hemocyty larvy vijačky voštinovej (*Galleria mellonella*), avšak nebolo pozorované žiadne výrazné poškodenie štruktúry buniek. Rovnako bola pozorovaná väzba lektínu na kutikulu hlístovcov *Heterorhabditis bacteriophora* bez toxického účinku. Zdá sa tak, že lektín

nemá cytotoxický efekt, ale môže plniť úlohu pri mediácii interakcie hmyzích hemocytov s kutikulou hlístovcov (58).



Obrázok 9: Celková štruktúra rekombinantného lektínu PLL z *P. luminescens* v komplexe s L-fukózou. Na obrázku je vidieť tetramérne usporiadanie z boku (A) a spredu (B) spolu s 12 molekulami L-fukózy (tri molekuly na monomér). Obrázky prevzaté z PDBe (5c9p).

CIELE PRÁCE

- Optimalizácia purifikácie lektínov z *P. luminescens*
- Charakterizácia lektínov s využitím biofyzikálnych metód
- Testovanie aglutinačnej aktivity lektínov
- Kryštalizácia proteínov s cieľom nájsť vhodné kryštalizačné podmienky

PRAKTICKÁ ČASŤ

3 Materiály a metódy

3.1 Kultivácia buniek

V práci boli využívané expresné kmene bakteriálnych buniek *Escherichia coli* Tuner(DE3) (Novagen) a BL21(DE3) (Stratagene), ktoré obsahovali vložené konštrukty pET25b-plu0734 a pET25b-plu0735 pre expresiu proteínov PLU34 a PLU35. Práca s bunkami prebiehala v sterilnom prostredí lamilárneho boxu (*Thermo Electron Industries*).

Pre rast baktérií bolo využívané sterilné, komerčne dostupné, kultivačné LB médium (20 g LB low salt zmesi o zložení: 5 g NaCl, 10 g tryptón, 5 g kvasnicový extrakt na 1 l média, *Formedium*). Po rozpustení zmesi bolo pH média upravené pomocou 10 M NaOH na hodnotu 7,4. Médium bolo sterilizované autoklávovaním (*Systec V150*). Pred samotnou kultiváciou bolo do média pridané antibiotikum ampicilín (*Serva*) do výslednej koncentrácie 100 µg.ml⁻¹.

Štandardne boli do sterilného LB média s pridaným antibiotikom zaočkované bunky *E.coli* s vybraným konštruktom a kultivované pri 37 °C/180 rpm (*N-Biotek NB-205*) do optickej hustoty OD₆₀₀ = 0,4-0,6. Ďalej práca pokračovala expresiou vybraných proteínov.

3.2 Expresia rekombinantných proteínov

Po príprave inokula o vhodnej optickej hustote bol 1 ml kultúry sterilne prenesený do 50 ml LB média s pridaným ampicilínom (100 µg.ml⁻¹). Bunky boli kultivované pri 37 °C/180 rpm do optickej hustoty OD₆₀₀ = 0,4-0,6. Následne bolo 10 ml kultúry naočkovaných do 500 ml pripraveného LB média s príslušným antibiotikom a bunky boli opäť kultivované pri 37 °C/180 rpm do optickej hustoty OD₆₀₀ = 0,4-0,6 (*Infors HT Multitron standard*). Expresia proteínu bola indukovaná pridaním izopropyl-β-D-tiogalaktopyranozidu (*Carbosynth*) do výslednej koncentrácie 0,5 mM. Expresia prebiehala pri 18 °C/180 rpm cez noc.

Po expresii bol celý objem kultúry (500 ml) centrifugovaný (10 min/11 000 g/4 °C, *Sigma 6-16K*) a pelet rozsuspendovaný v 15, resp. 30 ml pufru (20 mM Tris/HCl, pH 7,4). Vzorky boli skladované pri -20 °C.

V priebehu experimentu boli pred a po indukcii odobrané vzorky kultúry pre overenie množstva exprimovaného proteínu. Bol odobraný 1 ml kultúry z každej kultivačnej banky, pričom vzorka odobraná po indukcii bola nariadená LB médiom na približne rovnakú optickú hustotu ako príslušná vzorka odobraná pred indukciou. Vzorky boli centrifugované (1 min/13 000 rpm, *Hettich Mikro 20*) a pelet rozsuspendovaný v 20 µl 4 M močoviny a 20 µl 2x koncentrovaného vzorkového pufru (20% glycerol, 6% merkaptoetanol, 4% SDS, 0,2% brómfenolová modrá, 0,1 M Tris/HCl, pH 6,8). Vzorky boli denaturované (95 °C/5 min, *Accublock Digital Dry Bath, Labnet International*) a analyzované pomocou SDS-PAGE.

3.3 Príprava vzorky pre purifikáciu

Zmrazená kultúra buniek bola ponechaná rozmraziť v miske s ľadom. Následne bola kultúra preliata do umelohmotnej kadičky a umiestnená do misky s ľadom. Bunky boli dezintegrované s využitím sonikátora (*Sonics Vibra-Cell VCX-500*) pri nasledujúcich podmienkach: 2x 50 min, 1 s pulz, 4 s pauza, 40% amplitúda. Z homogenizovanej kultúry bolo odobratých 100 µl vzorky pre zistenie či sa proteín exprimuje v rozpustnej forme. Vzorka bola centrifugovaná (1 min/13 000 rpm) a zo supernatantu bolo odobratých 20 µl a zmiešaných s 20 µl 2x koncentrovaného pufru (rozpustná frakcia, CS). Pelet bol dvakrát premytý 1 ml pufru (20 mM Tris/HCl, pH 7,4), centrifugovaný (1 min/13 000 rpm) a rozsuspendovaný v 50 µl 4 M močoviny a 50 µl 1% SDS. Bolo odobratých 20 µl vzorky a zmiešaných s 20 µl 2x koncentrovaného pufru (nerozpustná frakcia, CI). Vzorky boli denaturované (95 °C/5 min) a analyzované pomocou SDS-PAGE.

Homogenizovaná kultúra bola pred nanesením na purifikačnú kolónu prefiltrovaná cez sterilný filter s veľkosťou pórov 0,45 µm (*Roth*).

3.4 Purifikácia rekombinantných proteínov

Rekombinantné proteíny PLU34 a PLU35 boli purifikované na kolóne s manózo-agarózovým sorbentom, s využitím strednotlakovej kvapalinovej chromatografie, na prístroji ÄKTA Purifier (*GE Healthcare*). Kolóna bola pred nanesením vzorky ekvilibrovaná premytím pufrom B (20 mM manóza, 100 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5), pufrom A' (100 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5) a pufrom A (20 mM Tris/HCl, pH 7,5). Prefiltrovaná vzorka po dezintegrácii buniek bola nanášaná na kolónu štandardne pri prietoku 0,1-0,3 ml/min. Elúcia prebiehala izokraticky a jednotlivé frakcie boli zbierané

do 10 ml skúmaviek. Ako elučný pufer bol použitý pufer B, A' a mili-Q voda. Z jednotlivých frakcií bolo odobraných 20 µl vzorky, ktorá bola zmiešaná s 20 µl 2x koncentrovaného vzorkového pufru. Vzorky boli denaturované (95 °C/5 min) a analyzované pomocou SDS-PAGE.

3.5 SDS-PAGE elektroforéza

Elektroforéza v polyakrylamidovom géli v prítomnosti dodecylsulfátu sodného bola použitá pre zistenie relatívneho zastúpenia proteínov a čistoty vzoriek proteínov po purifikácii. Príprava gélov aj samotná elektroforéza prebiehala v aparátúre Mini-Protean 3 (*Biorad*). Zloženie gélov je uvedené v **tabuľke I**. Ako separačný gél bol použitý 12% polyakrylamidový gél. Denaturované vzorky boli na gél nanášané v objeme 10 µl s použitím dávkovacej striekačky (*Hamilton*). Bol použitý proteínový štandard Protein Marker III 6.5 – 200 (*AppliChem*), ktorý bol nanášaný v objeme 5 µl. Elektroforéza prebiehala pri konštantnom napätí 120 V v prítomnosti 1x koncentrovaného elektródového pufru (25 mM Tris/HCl, 250 mM glycín, 0,1% SDS, pH 8,3).

Tabuľka I: Zloženie separačného a koncentračného gélu pre SDS-PAGE (pre dva gély)

Zloženie	Separačný gél 12%	Koncentračný gél
Deionizovaná voda	3,4 ml	3,4 ml
30% akrylamid	4,0 ml	0,83 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	2,5 ml	-
1,0 M Tris/HCl (pH 6,8)	-	0,63 ml
10% SDS	0,1 ml	50 µl
10% APS	80 µl	80 µl
TEMED	7 µl	5 µl
Celkom	10 ml	5 ml

Po skončení elektroforézy boli gély ponorené do fixačného roztoku (10% kyselina octová, 30% izopropanol) na dobu 10 minút. Gély boli štandardne farbené cez noc, ponorením do farbiaceho roztoku (0,025% Coomasie Brilliant Blue R250, 50% metanol, 10% kyselina octová). Pre odfarbenie pozadia boli gély ponorené do odfarbovacieho roztoku (10% kyselina octová, 40% etanol). Pre zvýšenie citlivosti farbenia

boli gély farbené striebrom. Postup farbenia striebrom je uvedený v **tabuľke II**. Gély boli uchovávané v destilovanej vode pri laboratórnej teplote.

Tabuľka II: Postup farbenia polyakrylamidového gélu striebrom

Krok	Čas
Premytie deionizovanou vodou	3 x 5 s
60 ml 50% acetónu	5 min
100 µl 10% $\text{N}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 60 ml deionizovanej vody	1 min
Premytie deionizovanou vodou	3 x 5 s
160 mg AgNO_3 , 0,6 ml 37% HCHO , 60 ml dH_2O	8 min
Premytie deionizovanou vodou	2 x 5 s
60 ml 2% Na_2CO_3 , 25 µl 37% HCHO , 25 µl 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Do vyfarbenia
1% kyselina octová	30 s

3.6 Vsádková metóda

Jednoduché a rýchle otestovanie väzbovej špecifity proteínov PLU34 a PLU35 k vybraným monosacharidom bolo uskutočnené pomocou vsádkovej metódy. Pri interakcii dochádza k väzbe proteínu na sacharid naviazaný na agarózový nosič.

Bolo odobraných 100 µl sorbentu s naviazaným sacharidom: L-fukóza (pripravená na pracovisku), D-manóza (*Sigma*). Sorbent bol centrifugovaný (2 min/13 000 rpm), supernatant odstránený a suchý sorbent 3-krát premytý pufrom (20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 100 µM CaCl_2 , pH 7,4). K takto pripravenému sorbentu bolo pridaných 75 µl bunkového lyzátu a zmes bola inkubovaná 30 minút pri laboratórnej teplote za občasného premiešania. Po centrifugácii (1 min/13 000 rpm) bolo zo supernatantu odobraných 25 µl zmesi (nezachytené frakcie). Sorbent bol 3-krát premytý pufrom a po každom premytí bolo zo supernatantu odobraných 25 µl vzorky. Všetky odobrané vzorky boli zmiešané s 2x koncentrovaným vzorkovým pufrom v pomere 1:1. Na záver bolo k sorbentu pridaných 30 µl 2x koncentrovaného vzorkového pufru. Všetky pripravené vzorky boli denaturované (5 min/95 °C), centrifugované (1 min/13 000 rpm) a analyzované pomocou SDS-PAGE.

3.7 Dialýza

Frakcie proteínu zozbierané po purifikácii boli dialyzované proti 10 litrom destilovanej vody pre kryštalizáciu proteínov a proti 10 litrom pufru (20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4) pre testy interakcií proteínu so sacharidmi (ITC, SPR). Bolo použité dialyzačné črevo (SnakeSkin, cut-off limit 3,5 kDa, *Thermo Scientific*). Dialýza prebiehala pri 4 °C po dobu 3 dní, pričom vedro bolo menené 3-krát.

3.8 Koncentrovanie proteínu

Frakcie proteínu boli zakoncentrované s využitím koncentračných skúmaviek Vivaspin (*Sartorius*) s membránou s cut-off limitom 10 kDa alebo komerčnej sústavy Amicon (objem cely 10 ml) s membránou s cut-off limitom 10 kDa (*Millipore*). Ultrafiltrácia prebiehala za stáleho miešania pod tlakom dusíka 10-15 kPa do dosiahnutia požadovanej koncentrácie. Vzorky proteínu koncentrované pomocou koncentračných skúmaviek boli centrifugované pri laboratórnej teplote (11 000 rpm) do požadovanej koncentrácie. Koncentrácia proteínu bola stanovená spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 280 nm na prístroji NanoDrop ND-1000 (*Coleman Technologies*).

3.9 Analytická ultracentrifugácia

Meranie sedimentačnej rýchlosti bolo uskutočnené na analytickej ultracentrifúge ProteomeLab XL-A (*Beckman Coulter*) s využitím absorbančnej a interferenčnej optiky. Meranie prebiehalo v dvojsektorovej cele za nasledujúcich podmienok: 20 °C, 48 000 rpm, snímky zaznamenávané po 5 minútach, zber dát po 0,003 cm, vlnová dĺžka 280 nm. Objem vzorky proteínu a referenčného pufru bol 425 µl. Koncentrácie vzoriek sa pohybovali v rozmedzí 0,03 - 0,23 mg.ml⁻¹. Vzorky boli pred meraním dialyzované proti pufru (20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4), ktorý bol následne použitý ako referenčný. Vzorky boli prefiltrované cez filter s veľkosťou pórov 0,2 µm (*VWR*) a napipetované do ciel.

Namerané dáta boli vyhodnotené v programoch Sedfit a Sednterp. Výsledky boli zobrazené v programe Gussi.

3.10 Izotermálna titračná kalorimetria

Interakcie proteínu PLU34 so sacharidmi boli merané pomocou ITC. Merania boli uskutočnené na prístrojoch ITC200 (*Malvern*) a AutoITC200 (*Malvern*) pri teplote 25 °C. Pri meraniach boli použité monosacharidy D-manóza (*Sigma-Aldrich*), L-fukóza (*AppliChem*) a tetrafukozylované zlúčeniny kalixarén IVc a dendrimér BB01, syntetizované v laboratóriu profesorky Jitky Moravcovej (Ústav chemie a prírodných látok, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha). Sacharidy boli rozpustené v dialyzačnom pufri (20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4). Koncentrácia proteínu sa pohybovala v rozmedzí 0,071 – 0,1 mM a koncentrácie ligandov v rozmedzí 2 – 10 mM, v závislosti na väzbovej afinite. Pred meraním boli vzorky proteínu a sacharidov odvzdušnené, premiešané a vytemperované na teplotu 25 °C. Vzorky sacharidov boli titrované do cely naplnenej vzorkou proteínu po iniciačnom oneskorení 60 s. Bolo použitých 20 – 35 titrácií o objeme 1,1 – 2 µl v trvaní 2,2 – 4 s. Doba medzi jednotlivými meraniami bola zvyčajne 240 s. Merania boli uskutočnené za stáleho miešania (750 – 1000 rpm) s referenčnou silou 10 µcal.s⁻¹. Výsledky merania boli vyhodnotené v programe Origin 7.

3.11 Rezonancia povrchového plazmónu

Merania boli uskutočnené na prístroji BIAcore 3000 (*GE Healthcare*), pri 25 °C, s použitím 20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 ako nanášacím pufrom. Boli použité tri štvorkanálové čipy s imobilizovanými sacharidmi: CM5 (D-galaktóza, streptavidín, D-manóza, Lewis B), čip C1 (Neu-Ac, D-manóza, L-fukóza, laktóza), čip CM4 (D-manóza, D-galaktóza, L-fukóza). Meranie prebiehalo simultánne na štyroch kanáloch, z ktorých vždy jeden slúžil ako blank. Vzorka proteínu o koncentrácii 0,4 – 0,5 mg.ml⁻¹ v 20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 pufri bola na čip nanášaná v objeme 20 µl pri prietoku 5 µl.min⁻¹. Väzba proteínu na sacharidy bola sledovaná ako závislosť rezonančných jednotiek (RU) na čase a namerané dáta boli vyhodnotené v programe BIAevaluation, pomocou ktorého bolo tiež uskutočnené odčítanie signálu referenčného kanálu.

3.11.1 Testy priamej väzby

Prvotné merania väzbovej špecifity proteínu PLU34 s imobilizovanými sacharidmi boli uskutočnené metódou priamej väzby, pričom proteín bol štandardne dialyzovaný proti nanášaciemu pufri a injektovaný na čip. Čip bol regenerovaný 50 mM NaOH.

3.11.2 Inhibičné testy

Väzbová špecifita proteínu PLU34 bola tiež zisťovaná metódou inhibičných testov. Pri prvotných testoch bolo vybratých päť monosacharidov: D-manóza (*Sigma-Aldrich*), L-fukóza (*AppliChem*), D-galaktóza (*Carbosynth*), D-glukóza (*Carbosynth*) a D-fruktóza (*Duchefa Biochemie*). 10x koncentrované roztoky sacharidov (100 mM) boli zmiešané so vzorkou proteínu o koncentrácii 10 μ M v molárnom pomere proteín:sacharid 1:9 a zmes bola nanesená na čip CM4. Pre určenie IC₅₀, inhibičnej koncentrácie sacharidu (inhibítora), pri ktorej dochádza k 50% inhibícii väzbovej interakcie, bol vytvorený koncentračný rad štyroch monosacharidov (D-manóza, L-fukóza, D-galaktóza, D-fruktóza), v rozmedzí koncentrácií 20-0 mM, pričom každá nasledujúca koncentrácia bola riedená dvojnásobne oproti predchádzajúcej.

3.12 Aglutinačné testy

3.12.1 Hemaglutinácia

Testovanie hemaglutinačnej aktivity proteínu PLU34 bolo uskutočnené v 96-jamkových mikrotitračných doštičkách. 50 μ l proteínu o koncentrácii 0,6 mg.ml⁻¹ v elučnom pufrí (20 mM Tris/HCl, pH 7,5) bolo zmiešaných s rovnakým objemom 2% suspenzie ľudských erytrocytov krvných skupín A+, B+, 0-, 0+ nariedených PBS pufrom (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,4). Bol vytvorený riediaci koncentračný rad proteínu (dvojková sada). Erytrocyty boli pred použitím ošetrené 0,1% papaínom, inkubované 30 minút pri 37 °C za občasného premiešania. Ako negatívna kontrola bol použitý pufer bez proteínu. Hemaglutinácia bola vyhodnotená vizuálne. Ľudské erytrocyty boli získané od Transfúzneho a tkanivového oddelenia Fakultnej nemocnice v Brne.

3.12.2 Aglutinácia kvasiniek

Boli pripravené 10 a 20% suspenzie kvasníc (*UNIFERM*) v 20 mM Tris/HCl, pH 7,5. Na aglutináciu bol použitý proteín PLU34 (1,5 mg.ml⁻¹) v 20 mM Tris/HCl, pH 7,5. Ako pozitívna kontrola bol použitý lektín BC2L-A (1 mg.ml⁻¹). Boli použité dva typy inkubácie kvasníc s lektínom. Pri inkubácii v skúmavke bolo zmiešaných 20 μ l proteínu s 20 μ l kvasníc a ponechaných 10 minút stáť pri laboratórnej teplote. Následne bolo na podložné sklíčko napipetovaných 20 μ l zmesi. Pri inkubácii na podložnom sklíčku bolo napipetovaných

10 μ l kvasníc a 10 μ l proteínu, zamiešaných a ponechaných 5 minút stáť pri laboratórnej teplote. Zmes bola prekrytá krycím sklíčkom a pozorovaná pod optickým mikroskopom (2L NG, *Levenhuk*) s digitálnou kamerou (D2L NG, *Levenhuk*).

Aglutinácia kvasiniek bola tiež otestovaná s fluorescenčne značeným proteínom PLU34 (NT-647, *NanoTemper Technologies*). Bola pripravená 2% suspenzia kvasníc (*UNIFERM*) v 20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 100 μ M CaCl₂, pH 7,5. Fluorescenčne značený proteín PLU34 s koncentráciou 3 μ M bol 20-krát, 100-krát a 200-krát riedený suspenziou kvasníc a zmes bola inkubovaná v tme (30 min/17 °C). Následne boli suspenzie 2-krát premyté 250 μ l pufru pre vymytie nenaviazaného proteínu. Na podložné sklíčko bolo nanesených 20 μ l vzorky a prekrytých krycím sklíčkom. Všetky vzorky boli pozorované pomocou invertovaného mikroskopu IX81 (*Olympus*). Bolo použité modré svetlo (470 – 495 nm) pre excitáciu fluoroforu a bola pozorovaná zelená fluorescencia (575 – 625 nm). Obrázky boli získané s použitím digitálnej kamery DP72 (*Olympus*).

3.13 Proteínová kryštalizácia

Pre hľadanie vhodných kryštalizačných podmienok pre kryštalizáciu proteínu PLU34 bola použitá metóda sediacej kvapky. Na skríning boli použité 96-jamkové dosky (3 well, *Swissci*) a činidlá nasledujúcich komerčných sád: Classics Suite, Classics II Suite, Classics Lite Site, PACT Suite (všetky *Qiagen*), JCSG-plus Screen, SG1 Screen HT-96 (oba *Molecular Dimensions*). Do rezervoáru jamiek bolo nanášaných 50 μ l precipitantu pomocou pipetovacej linky Freedom EVO Clinical 150 (*Tecan*). Pre prípravu kvapiek o objeme 200 nl bol použitý kryštalizačný robot Mosquito (*TTP Labtech*). Kvapky boli pripravené zmiešaním roztoku proteínu o vstupnej koncentrácii 10 mg.ml⁻¹ s roztokom precipitantu v troch pomeroch 1:2, 1:1 a 2:1. Dosky boli prekryté priehľadnou, UV priepustnou fóliou, označené čiarovým kódom a umiestnené do kryštalizačného hotela Gallery 160 Plate Hotel (*Rigaku*) vybaveného systémom pre analýzu rastu kryštálov Desktop Ministrel HT UV (*Rigaku*). Kryštalizácia prebiehala pri 20 °C a kryštály boli priebežne sledované prostredníctvom rozhrania CrystalTrek WEB 2.3.5.

Podmienky, v ktorých došlo k rastu kryštálov s najlepšimi vlastnosťami, boli ďalej optimalizované. Bola použitá metóda sediacej kvapky, ako je opísané vyššie. Boli optimalizované pH pufov, koncentrácie solí a precipitantov. Boli tiež nasadené dosky pre kokryštalizáciu proteínu PLU34 s vybranými sacharidmi: D-manóza, L-fukóza, D-glukóza, D-galaktóza, N-acetyl-L-fukozamín, metyl- α -D-manopyranozid, metyl- α -L-fukopyranozid,

Man α 1-3Man, Man α 1-2Man/Man α 1-4Man a so synteticky pripravenými fukozylovanými makromolekulami: kalixarén IVc, dendrimér BB01, inhibitory BOT1, BOT2, BOT3 syntetizované v laboratóriu profesorky Jitky Moravcovej (Ústav chemie a prírodných látok, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha).

Pre optimalizáciu kryštalizácie a kokryštalizáciu proteínu so sacharidmi (D-manóza, L-fukóza) bola tiež použitá metóda visiacej kvapky. Boli použité 24-jamkové dosky (Linbro Plate). Do jamiek bolo napipetovaných 600 μ l precipitačného roztoku. Proteín o vstupnej koncentrácii 10 mg.ml⁻¹ bol na silikonizovanom sklíčku (*Hampton Research*) zmiešaný s precipitantom resp. sacharidom v pomere 1:1 a 2:1 o objeme kvapky 1 – 3 μ l. Sklíčka boli prevrátené a priložené k lemu jamiek opatreným vazelínou pre dokonalé priľnutie. Dosky boli skladované pri stálej teplote 20 °C a rast kryštálov bol pozorovaný pod optickým mikroskopom Leica MZ 125 (*Leica*).

Vhodne kryštály boli vylovené, opatrené kryoprotentantom 40% PEG 400 a prenesené v tekutom dusíku. Difrakcia kryštálov bola testovaná na synchrotróne BESSY II (Berlín, Nemecko).