

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Veronika Zachovalová

Základ strukturně-funkční studie vybraných enzymů 4-alkyl- L-prolinové dráhy
The basis of the structural-functional study of selected enzymes from the 4-alkyl- L-proline
pathway

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Lucie Zdvořáková, Ph.D.

Praha, 2023

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 8. 8. 2023

.....
Bc. Veronika Zachovalová

Poděkování

Největší poděkování patří mé školitelce RNDr. Lucii Zdvořákové, Ph.D., která se mi plně věnovala, děkuji za její vstřícný přístup, cenné rady, ochotu a velkou trpělivost a moc si vážím času, který musela vynaložit pro vedení mé práce. Děkuji také všem členům Laboratoře biologie sekundárního metabolismu za vstřícné a přátelské prostředí, dále také Ing. Janu Stránskému, PhD. (Biotechnologický ústav, AV ČR, v.v.i.) za odborné rady ohledně krystalizace a dalších specializovaných metod. Poděkování také patří mému nejbližšímu okolí, které mě během psaní práce podporovalo.

Práce vznikla v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky, v. v. i., v Laboratoři biologie sekundárního metabolismu.

Tato práce byla podpořena v rámci projektů:

- Projekt Národní institut virologie a bakteriologie (Program EXCELES, ID: LX22NPO5103) - Financováno Evropskou unií - Next Generation EU.
- Projekt č. 20-09811Y od Grantové agentury ČR a projekt č. LQ200202002 (Lumina Quaruntur) od Akademie věd ČR.

Abstrakt

4-alkyl-L-prolinový derivát (APD) je stavebním blokem několika důležitých bioaktivních specializovaných metabolitů produkovaných aktinobakteriemi. Nachází se například ve struktuře antibiotika linkomycinu, bakteriálního hormonu s antimikrobiálním účinkem hormaomycinu, antituberkulotika griselimycinu či pyrrolo-1,4-benzodiazepinů (PBD), které mají protinádorové účinky. APD, či jejich prekursory, vznikají z L-leucinu či L-tyrosinu v unikátní biosyntetické dráze tvořené až šesti homologními proteiny označovanými Apd1 - Apd6.

První část práce pokládá základ krystalizační studii SAM-závislé methyltransferasy Apd3 z biosyntézy linkomycinu - proteinu LmbW, za účelem objasnění skutečné podoby přirozeného substrátu tohoto proteinu, který je stále předmětem vědeckých diskuzí. Byla optimalizována metoda purifikace poskytující protein LmbW dostatečné kvantity, kvality a čistoty pro krystalizaci, následně byly definovány základní krystalizační podmínky umožňující růst krystalů.

Druhá část práce se zabývá objasněním odlišné reakční specifity Apd6 homologních proteinů - $F_{420}H_2$ -závislých oxidoreduktas, katalyzujících jedno- (Por15 - biosyntéza PBD porothramycinu) či dvojnásobnou (LmbY - biosyntéza linkomycinu) redukci na identickém substrátu se dvěma konjugovanými dvojnými vazbami. Na základě recentně vyřešené struktury apoenzymu LmbY byly stanoveny hypotézy o rozdílných interakcích substrátu a kofaktoru F_{420} ve vazebném místě, které by mohly být podstatou odlišné reakční specifity Apd6 homologů. Hypotézy byly ověřovány pomocí místně-specifické mutagenese, reakční specifita mutant byla následně testována *in vitro*. Hypotézy se nepodařilo prokázat, proto bylo dále přistoupeno ke krystalizaci homologu Por15. Nicméně, přes veškeré úsilí se krystaly Por15 dostatečné kvality nepodařilo získat a je zřejmé, že krystalizace Por15 není triviální záležitostí. Získání difrakčních dat je však pro úspěšné vyřešení podstaty rozdílné reakční specifity Apd6 homologů zcela nezbytné a bude tak předmětem návazných studií.

Klíčová slova: specializovaný metabolismus, linkomycin, pyrrolo-1,4-benzodiazepiny, 4-alkyl-L-prolinové deriváty (APD), SAM-závislá methyltransferasa, $F_{420}H_2$ -závislé oxidoreduktasy

Abstract

4-alkyl-L-proline derivate (APD) is building block of some important, bioactive specialized metabolites produced by Actinobacteria. It is found, for example, in the structure of lincosamide antibiotic lincomycin, bacterial hormone hormaomycin having antimicrobial activity, the antituberculosis compound griselimycin and pyrrolo-1,4-benzodiazepins (PBD) which have anticancer effects. APDs, or their precursors, are formed from L-leucine or L-tyrosin in a unique biosynthetic pathway consisting of up to six homologous proteins named Apd1 - Apd6.

The first part of this thesis lays the foundation for a crystallization study of SAM-dependent methyltransferase Apd3 from the biosynthesis of lincomycin - the protein LmbW, in order to elucidate the identity of its natural substrate, which remains up to date a subject of scientific discussions. A purification method providing LmbW protein of sufficient quantity, quality and purity for crystallization was optimized. Subsequently the crystallization conditions allowing crystal growth were defined.

The second part of the thesis deals with the elucidation of molecular basis of different reaction specificity of homologous $F_{420}H_2$ -dependent oxidoreductases, Apd6. They catalyse reduction of identical substrate with two conjugated double bonds, however, some of them (for example Por15 - from porothramycin biosynthesis) catalyze only one double bond reduction while another (LmbY - from lincomycin biosynthesis) reduces two double bonds. Based on the recently solved structure of apozyme LmbY, the different substrate and cofactor F_{420} interactions in active site were hypothesized to underlie the different specificity of the Apd6 homologues. The hypotheses were tested using site-directed mutagenesis and subsequent measuring of the reaction specificity of mutated proteins *in vitro*, however, it did not allow to prove the hypotheses. Therefore, the crystallization of the Por15 homologue was proceeded. Despite all efforts, Por15 crystals of sufficient quality could not be obtained yet. However, obtaining diffraction data is absolutely necessary to successfully resolve the nature of the different reaction specificities of the Apd6 homologues and will thus be the subject of follow-up studies.

Key words: specialized metabolism, lincomycin, pyrrolo-1,4-benzodiazepins, 4-alkyl-L-proline derivatives, SAM-dependent methyltransferase, $F_{420}H_2$ -dependent oxidoreductases

Seznam použitých zkratk

Adf - F₄₂₀-redukující sekundární alkoholdehydrogenasa

APD - 4-alkyl-L-prolinový derivát

Apd1 - Apd6 - označení homologních proteinů účastnících se APD biosyntetické dráhy

APS - peroxodisíran amonný

BGS - biosyntetický genový shluk

Bis-Tris - Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan

Bis-Tris-propan - 1,3-bis(tris(hydroxymethyl)methylamino)propan

BSA (Bovine Serum Albumin) - hovězí serový albumin

CV (Column Volume) - objem kolony

DDN - deazaflavin-závislé nitroreduktasy

DLS (Dynamic Light Scattering) - dynamický rozptyl světla

DTT - 1,4-dithiothreitol

EDTA - ethyldiaminotetraoctová kyselina disodná sůl dihydrát

EtBr - ethidium bromid

FAD - flavinadenindinukleotid

FDOR - flavin-/deazaflavinové oxidoreduktasy

FGD - glukosa-6-fosfát dehydrogenasa

FMN - flavinmononukleotid

HCOOH - kyselina mravenčí

HEPES - kyselina *N'*-2-hydroxyethylpiperazin-*N'*-2 ethansulfonová

IPTG - isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid

KLD - kinasa, ligasa, *DpnI*

L-DOPA - L-3,4-dihydroxyfenylalanin

LLHT (Luciferase-Like Hydride Transferases) - od luciferas odvozené hydridové transferasy

Mer - F₄₂₀-závislá methylenetetrahydromethanopterin reduktasa

MES - 2-ethansulfonová kyselina

MOPS - 3-(*N*-morfolino)propansulfonová kyselina

MPL - 4-methyl-L-prolinový derivát

MT - methyltransferasa

Mtb-FGD1 - glukosa-6-fosfát dehydrogenasa vyizolovaná z *Mycobacterium tuberculosis*

Mtd - F₄₂₀-redukující methenyltetrahydromethanopterin dehydrogenasa
nanoDSF (Nano Differential Scanning Fluorimetry) - nano-diferenční skenovací fluorimetrie
NRPS - neribozomální peptidová syntetasa
OD - optická densita
OD₆₀₀ - optická densita při 600 nm
PBD - pyrrolo-1,4-benzodiazepiny
PCR (Polymerase Chain Reaction) - polymerázová řetězová reakce
PEG - polyethylenglykol
PNPO - pyridoxin-5'-fosfát oxidasy
PPL - 4-propyl-L-prolin
Ppy - fenylypyruvát
Rh-FGD1 - glukosa-6-fosfát dehydrogenasa vyizolovaná z *Rhodococcus jostii*
Rv2074 - F₄₂₀H₂-závislá biliverdin reduktasa z *Mycobacterium tuberculosis*
SAH - S-adenosyl-L-homocystein
SAM - S-adenosyl-L-methionin = AdoMet
SAM-MT - SAM-závislá methyltransferasa
SDS - dodecylsírán sodný
SDS-PAGE - SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza
TAE pufr - Tris-acetát-EDTA pufr
TAPS - 3-(Tris(hydroxymethyl)methylamino)-1-propansulfonová kyselina
TCEP - tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid
TEMED - N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin
TEW - Anderson-Evans polyoxotungstát
T_m (Melting Temperature) - teplota tání
t_R - retenční čas
UHPLC-MS (Ultra High-Performance Liquid Chromatography - Mass Spectroscopy) - vysoce účinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
γGCS-GS - γ-glutamylcystein syntetasa - glutathion syntetasa

Obsah

1. Úvod.....	11
2. Literární přehled	13
2.1 Metabolity inkorporující APD motiv	13
2.1.1 Linkosamidy - linkomycin, intervencin.....	13
2.1.2 Pyrrolo-1,4-benzodiazepiny (PBD).....	16
2.1.3 Hormaomycin.....	18
2.1.4 Griselimycin	19
2.1.5 APD v dalších aktinobakteriálních metabolitech	20
2.1.6 APD motiv mimo <i>Actinobacteria</i>	20
2.2 Znaky BGS pro biosyntézu metabolitů s APD motivem u aktinobakterií.....	21
2.2.1 BGS producenta linkomycinu se zaměřením na <i>apd</i> geny.....	22
2.2.2 <i>Apd</i> geny v BGS producentů intervencinu, PBD, hormaomycinu a griselimycinu.....	22
2.3 Biosyntéza aktinobakteriálních APD prekursorů	24
2.3.1 MPL dráha vycházející z L-leucinu	24
2.3.2 APD dráha vycházející z L-tyrosinu	25
3. Methyltransferasy	31
3.1 SAM-závislé methyltransferasy - <i>Apd3</i>	31
3.1.1 SAM-MT - využití v biotechnologiích.....	33
4. Kofaktor F₄₂₀ ve specializovaném metabolismu aktinobakterií.....	34
4.1 Deazaflavinový kofaktor F ₄₂₀	34
4.2 F ₄₂₀ H ₂ -závislé enzymy u bakterií.....	36
4.2.1 LLHT rodina - se zaměřením na F ₄₂₀ /F ₄₂₀ H ₂ -závislé enzymy	37
4.2.2 Hypotézy o rozdílné reakční specifitě <i>Apd6</i> proteinů	39
4.2.2.1 Hypotézy formulované na základě sekvenčních dat a homologních modelů.....	39
4.2.2.2 Hypotézy formulované na základě struktury <i>LmbY</i>	42
4.3 F ₄₂₀ -závislé enzymy - využití v biotechnologiích.....	46
5. Cíle práce.....	48
6. Materiál a metody	49
6.1 Materiál	49
6.1.1 Chemikálie.....	49
6.1.2 Standardy, referenční látky, látky připravené v laboratoři	50
6.1.3 Antibiotika.....	51
6.1.4 Použité bakteriální kmeny	52
6.1.5 Vektory pro heterologní nadprodukcí proteinů	52
6.1.6 Kity.....	52

6.1.7 Syntetické oligonukleotidy (primery).....	53
6.1.8 Použité aparatury, přístroje a chromatografické kolony.....	53
6.1.9 Použité softwarové programy, on-line databáze.....	54
6.1.10 Média a půdy pro kultivaci bakterií a nadprodukcí heterologních proteinů.....	55
6.1.11 Pufry a roztoky	55
6.2. Metody	58
6.2.1 Kultivace bakterií	58
6.2.1.1 Stanovení bakteriálního růstu za pomoci optické density	58
6.2.1.2 Kultivace kmenů <i>E. coli</i> - BL21 (DE3), BL21 (DE3)/ <i>pGroESL</i> , XL1-Blue, NEB 5-alpha	59
6.2.1.3 Příprava kompetentních buněk <i>E. coli</i> XL1-Blue	59
6.2.2 Metody práce s DNA.....	59
6.2.2.1 Stanovení koncentrace DNA spektrofotometricky	59
6.2.2.2 Elektroforéza DNA v agarózovém gelu	60
6.2.2.3 Transformace cizorodé DNA do buněk <i>E. coli</i> za použití metody teplotního šoku	60
6.2.2.4 Izolace plasmidové DNA	61
6.2.2.5 Polymerasová řetězová reakce (PCR)	62
6.2.2.6 PCR zprostředkovaná místně-specifická mutagenese plasmidové DNA (kit Q5 E0554S)	63
6.2.2.7 Ověření vložení mutací za pomoci sekvenování	64
6.2.3 Práce s rekombinantními proteiny.....	65
6.2.3.1 Stanovení koncentrace proteinů spektrofotometricky	65
6.2.3.2 Heterologní produkce proteinů.....	65
6.2.3.3 Uvolnění proteinů z buněk za pomoci ultrazvuku.....	66
6.2.3.4 Chromatografické metody purifikace rekombinantních proteinů.....	66
6.2.3.4.1 Afinitní chromatografie	66
6.2.3.4.2 Rozměrově-vylučovací chromatografie - gelová filtrační chromatografie.....	67
6.2.3.5 SDS-PAGE elektroforéza.....	68
6.2.4 Specializované metody určené k charakterizaci proteinů.....	69
6.2.4.1 Testování enzymatické aktivity proteinů.....	69
6.2.4.1.1 <i>In vitro</i> testování mutovaných proteinů LmbY a Por15	69
6.2.4.1.2 Ultra čistá kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií.....	69
6.2.4.2 Diferenciální skenovací fluorimetrie (nanoDSF)	71
6.2.4.3 Dynamický rozptyl světla (DLS - Dynamic Light Scattering).....	71
6.2.5 Příprava krystalů Por15 a LmbW	72
6.2.5.1 Nalezení základních krystalizačních podmínek proteinu LmbW	74
6.2.5.2 Optimalizace úspěšných podmínek poskytujících krystaly LmbW ve visící kapce	75
6.2.5.3 Optimalizace úspěšných podmínek poskytující krystaly Por15 ve visící kapce	75

6.2.5.2 Rentgenová analýza struktury proteinu	75
7. Výsledky	77
7.1 Determinace přirozeného substrátu LmbW za pomoci krystalografie	77
7.1.1 Produkce a purifikace proteinu LmbW	77
7.1.2 Stanovení stability proteinu LmbW.....	78
7.1.2.1 Testování stability LmbW v různých pufrech (nanoDSF)	78
7.1.2.2 Stanovení disperzity LmbW (DLS).....	81
7.1.3 Krystalizace LmbW.....	84
7.1.3.1 Iniciační krystalizační screening proteinu LmbW	84
7.1.3.2 Optimalizace krystalizace proteinu LmbW	88
7.2 Objasnění podstaty rozdílné reakční specifity Apd6 homologů - Por15 a LmbY.....	90
7.2.1 Cílená mutagenese proteinů Por15 a LmbY.....	90
7.2.1.1 Příprava konstruktů pro produkci mutantních variant proteinů Por15 a LmbY	91
7.2.1.2 Produkce a purifikace mutantních proteinů LmbY a Por15	92
7.2.1.3 <i>In vitro</i> testování enzymatické aktivity mutantních variant proteinů	94
7.2.2 Příprava krystalů pro stanovení 3D struktury proteinu Por15	97
7.2.2.1 Interpretace krystalizace proteinu Por15	98
7.2.2.3 Optimalizace krystalizace proteinu Por15.....	99
8. Diskuze	101
8.1 Determinace přirozeného substrátu LmbW za pomoci krystalografie	101
8.1.1 Produkce a purifikace LmbW.....	101
8.1.2 Stabilita LmbW v různých pufrech	101
8.1.3 Stanovení disperzity LmbW	106
8.1.4 Stanovení finálního purifikačního a krystalizačního pufru	107
8.1.5 Krystalizace LmbW.....	108
8.1.6. Model struktury LmbW - nové hypotézy	113
8.2 Odlišná reakční specifita Apd6 proteinů	116
8.2.1 Mutagenese proteinů LmbY a Por15	116
8.2.2 Krystalizace Por15.....	117
8.2.2.1 Krystalizace LLHT proteinů.....	118
8.2.2.2 Krystalizace - přístupy vedoucí ke zlepšení nukleace a růstu krystalů.....	120
9. Souhrn	121
10. Seznam použité literatury.....	122

1. Úvod

Jedním ze základních znaků živých organismů je schopnost metabolisovat. Produkty látkové přeměny, tedy metabolity, se dají rozdělit do dvou základních skupin - první skupina se nazývá primární neboli centrální metabolity a druhá skupina sekundární neboli specializované metabolity. Centrální metabolity se podílejí na mnoha životně důležitých funkcích, například na vývoji, růstu či rozmnožování buněk, jejich nedostatek či absence způsobí smrt buňky. Mezi primární metabolity patří například některé aminokyseliny, sacharidy, lipidy atd. Naopak specializované metabolity nejsou klíčové pro přežití a vyskytují se jen u některých druhů organismů. Jako příklady produktů specializovaného metabolismu mohou být například alkaloidy a terpeny u rostlin (shrnutí Guerriero et al., 2018) nebo antibiotika, antimykotika u bakterií či antimikrobiální látky hub (shrnutí v Bills & Gloer, 2016).

Významným producentem specializovaných metabolitů je kmen gramnegativních bakterií *Actinobacteria* (shrnutí v Katz & Baltz, 2016). Aktinobakterie jsou známy produkcí zejména antimikrobiálních látek. Tomuto kmeni je připisována produkce $\frac{2}{3}$ všech přirozeně produkovaných používaných antibiotik, ať už se jedná o medicínsky, veterinárně či v zemědělství používaná antibiotika. *Actinobacteria* produkují nejen antibiotika, ale také například antimykotika, antivirotika a dále i látky, které vykazují cytotoxický účinek vůči různým nádorovým tkáním. Nejvýznamnějším aktinobakteriálním rodem, co se týká objemu produkce bioaktivních látek, je pak uváděn rod *Streptomyces* (shrnutí v Jakubiec-Krzesniak et al., 2018).

Specializované metabolity jsou produkovány v biosyntetických dráhách za účasti enzymů, jejichž produkce je v genomu příslušného producenta kódována geny uspořádaných v tzv. biosyntetických genových shlucích (BGS). Tyto shluky nekódují pouze biosyntetické enzymy, ale také regulační proteiny, transportéry a další pomocné proteiny pro účinnou syntézu daného metabolitu (Medema & Fischbach, 2015). U aktinobakterií BGS obvykle zabírají okolo 16 % veškeré kódující kapacity, rekordmany v tomto ohledu jsou kmeny *Kutzneria albida*, *Streptomyces bingchenggensis* a *Streptomyces rapamycinicus*, které na specializované metabolity a jejich biosyntézu mají vyhrazeno přes 20 % své kódující kapacity a tvoří až 53 různých bioaktivních látek (shrnutí v Jakubiec-Krzesniak et al., 2018).

Streptomyces lincolnensis, přirozený producent antibiotika linkomycinu byl poprvé izolován v roce 1962 z půdy v Nevadě (Bergy et al., 1963). Chemicky se linkomycin skládá ze dvou základních stavebních jednotek spojených amidovou vazbou - aminocukerné a aminokyselinové (Hoeksema et al., 1964). Biosyntéza prekursorů obou stavebních jednotek probíhá odděleně (shrnutí v Janata et al., 2018). Tato práce se primárně zabývá pouze biosyntézou prekursoru aminokyselinové části.

Aminokyselinovou částí linkomycinu je tzv. 4-alkyl-L-prolinový derivát (APD), konkrétně *N*-methyl-4-propyl-L-prolin (linkomycin A) respektive *N*-methyl-4-ethyl-L-prolin (linkomycin B).

Prekursor APD linkomycinu vzniká v unikátní biosyntetické dráze vycházející z L-tyrosinu (Witz et al., 1971), která je v BGS producenta kódována sadou pěti (linkomycin B) či šesti (linkomycin A) genů (*apd* geny) (Peschke et al., 1995; shrnuto v Janata et al., 2018). Je zajímavé, že různé sady homologů *apd* genů byly nalezeny i v BGS producentů jiných látek, např. pyrrolo-1,4-benzodiazepinů (shrnutu v Gerratana, 2012), hormaomycinu (Höfer et al. 2011), griselimycinu (Lukat et al., 2017) či intervencinu (Guzman et al., v přípravě). Jedná se taktéž o metabolity s inkorporovaným APD motivem, přičemž biosyntetické dráhy, ve které tyto APD jednotky, či jejich prekursory, vznikají (dále označované jednotně jako „APD dráhy“), mohou vycházet nejen z L-tyrosinu (Hurley et al., 1975; Hurley et al., 1979; Witz et al., 1971), ale i z L-leucinu (Guzman et al., v přípravě; Lukat et al., 2017).

Tato práce cílí na dva konkrétní kroky APD dráhy. Jedním krokem je C-methylace katalyzovaná S-adenosyl-L-methionin (SAM)-závislou methyltransferasou na substrátu, jehož přesná podoba je stále předmětem vědeckých diskuzí (Kameník et al, 2018; Zhong et al. 2018). Druhým krokem je závěrečná redukce katalyzovaná $F_{420}H_2$ -závislými oxidoreduktasami s neobvyklou odlišnou reakční specifitou (Steiningerová et al., 2020), jejíž molekulární podstata dosud nebyla objasněna. Nutno podotknout, že v obou případech se jedná o katalytické aktivity se zajímavým potenciálem uplatnění v biotechnologickém průmyslu (Mascotti et al., 2021).

Studium enzymů biosyntetických drah na úrovni determinace 3D proteinových struktur je důležité pro plné pochopení katalytických mechanismů reakcí, přičemž tyto znalosti mohou být dále využity například k enzymatické modifikaci určitých molekul za účelem zlepšení jejich vlastností, či modifikaci samotného enzymu, například za účelem změny jeho substrátové specifity. Jinými slovy, pochopení strukturně-funkčních závislostí v enzymu je esenciálním předpokladem pro návrh i samotnou přípravu biologicky účinnějších substancí, které jsou vzhledem ke stále narůstající rezistenci vůči dostupným antimikrobiálním léčivům více než žádoucí. Položit základ studii, jak konkrétně struktura souvisí s funkcí u zmíněných enzymů, je majoritní náplní této práce. Objasnění 3D proteinové struktury a molekulárního pozadí katalytické aktivity studovaných enzymů se tak v tuto chvíli stává prerekvizitou pro jakékoliv další studie či konkrétní aplikace.

2. Literární přehled

2.1 Metabolity inkorporující APD motiv

Specializované metabolity jsou často složitější chemické struktury skládající se z několika základních stavebních jednotek. Tyto jednotky jsou buď látky běžně dostupné uvnitř buněk jako například aminokyseliny či acetylkoenzym A, nebo se jedná o složitější struktury, které musejí být v buňce speciálně vyrobeny za pomoci enzymů dané biosyntetické dráhy (shrnutí v Cavalier-Smith, 1992).

APD je příkladem unikátní stavební jednotky specializovaných metabolitů, která musí být v buňce speciálně vyrobena. U aktinobakterií bylo doposud popsáno jen několik metabolitů s inkorporovaným APD motivem, mezi tyto produkty patří linkosamidy linkomycin a intervencin, dále hormaomycin, některé pyrrolo-1,4-benzodiazepiny (PBD) (shrnutí v Janata et al., 2018) nebo griselimycin (Lukat et al., 2017).

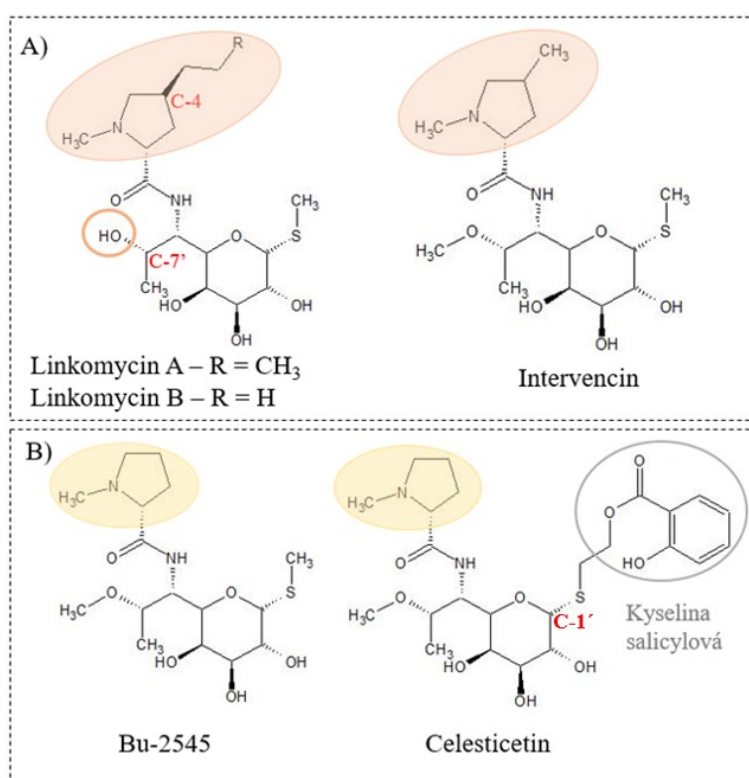
2.1.1 Linkosamidy - linkomycin, intervencin

Linkosamidy jsou poměrně mála skupina antibiotik. Skládají se ze dvou základních částí - aminocukerné a aminokyselinové (obr. 1). Během biosyntézy jsou prekursory obou částí spojeny za pomoci kondenzační reakce amidovou vazbou, výsledný kondenzát je dále modifikován do podoby finální molekuly (shrnutí v Janata et al., 2018). Mezi přirozeně produkované linkosamidy patří linkomycin A a B, izolovaný ze *Streptomyces lincolnensis* (Bergy et al., 1963), celesticetin, izolovaný ze *Streptomyces caelestis* (Hoeksema et al., 1955), intervencin, izolovaný z *Rhodococcus sp.* 06-235-1A (Guzman et al., v přípravě) a sloučenina Bu-2545 izolovaná ze *Streptomyces sp.* H230-5 (Hanada et al., 1980).

Z uvedených linkosamidů pouze linkomycin A (dále, není-li specifikováno, jen „linkomycin“), linkomycin B a intervencin mají do své struktury jako aminokyselinovou jednotku inkorporovaný specializovaný APD (Argoudelis et al., 1965; Guzman et al., v přípravě), který se liší pouze délkou bočního alkylového řetězce v pozici C-4 APD jednotky - linkomycin A nese v bočním řetězci tři uhlíky (3C), linkomycin B dva uhlíky (2C) (Argoudelis et al., 1965) a intervencin pouze jeden uhlík (1C) (Guzman et al., v přípravě) (obr. 1A). Ostatní uvedené metabolity, tedy celesticetin (Hoeksema, 1968) a Bu-2545 (Toda et al., 1981), obsahují jako aminokyselinovou podjednotku proteinogenní L-prolin, jehož speciální biosyntéza není potřeba.

Aminocukernou jednotkou linkomycinu A a B je α -methylthiolinkosamid (methyl-6-amino-6,8-dideoxy-1-thio-*D*-erythro- α -*D*-galaktooktopyranosid; Schroeder et al., 1967). Aminocukerná část intervencinu (Guzman et al., v přípravě) a Bu-2545 (Toda et al., 1981) se od linkomycinové liší pouze methylací hydroxyly v pozici C-7' (obr. 1A a 1B). U celesticetinu se spolu s methylací hydroxyly nachází navíc ještě salicylová kyselina (obr. 1B) připojená přes alifatický, dvouuhlíkový řetězec, který je napojen na atom síry aminocukerné jednotky (Hoeksema, 1968).

Za zmínku dále stojí semisyntetický linkosamid klindamycin, který je klinicky významný a používáný v praxi. Chemická struktura klindamycinu a linkomycinu je téměř totožná, jediný rozdíl je v pozici C-7', klindamycin nese v této pozici místo hydroxyly atom chloru (obr. 1A), chemicky se tedy klindamycin nazývá 7-chloro-7-deoxylinkomycin (Meyers et al., 1969).



Obr. 1: Chemické struktury přirozeně produkovaných linkosamidů. A = linkosamidy inkorporující APD - linkomycin A, linkomycin B a intervencin - APD jednotka je zvýrazněna oranžově, OH skupina v kroužku označuje místo chlorace linkomycinu v přípravě semisyntetického linkosamidu klindamycinu. B = celesticetin a Bu-2545 - proteinogenní L-prolin inkorporující linkosamidy - prolinová jednotka je zvýrazněna žlutě, dále u celesticetinu je v šedém kruhu vyznačena kyselina salicylová, která je připojena na aminocukernou jednotku v pozici C-1'.

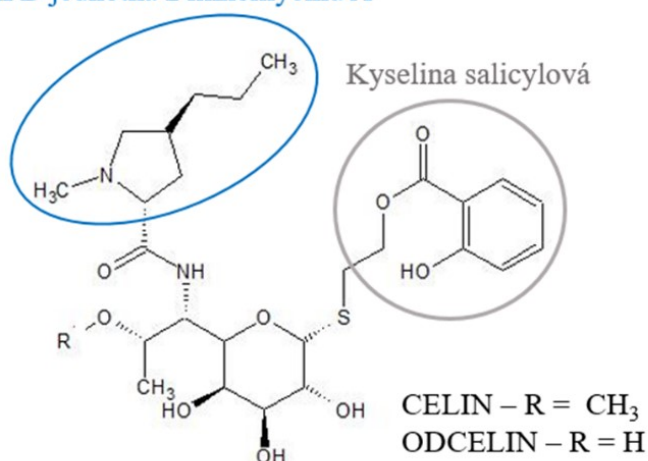
Linkosamidy cílí v bakteriální buňce na 50S podjednotku ribosomu. Aminocukerná část spolu s heterocyklickou částí APD podjednotky se přímo váží na peptidyltransferasové centrum a alkylový řetězec APD podjednotky interaguje s aminoacyl-tRNA. Dále ještě atom síry linkosamidů interaguje

s 23S rRNA. Výsledným efektem je inhibice prodlužování polypeptidového řetězce při translaci (Matzov et al., 2017).

Linkomycin i klindamycin působí na G⁺ bakterie jako například streptokoky, stafylokoky, pneumokoky, působí i na G⁺ tyčinky a G⁻ koky. Prakticky všechny anaerobní G⁻ bakterie jsou vůči linkosamidům rezistentní. Kvůli složitější struktuře buněčné stěny a přítomnosti periplasmy se antibiotikum do cytoplazmy bakteriální buňky nedostane, nebo mají bakterie obranné mechanismy v podobě methyloci zbytků na 23S rRNA, případně mohou také používat nespecifické efluxní pumpy (shrnutí ve Vardanyan & Hruby, 2006).

Biologická aktivita jednotlivých linkosamidů se liší, což je dáno jejich chemickou strukturou. Linkosamidy s delším postranním řetězcem APD jednotky v pozici C-4 vykazují vyšší biologickou aktivitu (shrnutí v Magerlein, 1971; Ulanova et al., 2010). Zvýšení biologické aktivity linkosamidů lze také dosáhnout substitucí hydroxylové skupiny v pozici C-7' za halogen, jak bylo ukázáno u klindamycinu (shrnutí v Magerlein, 1971). Na biologickou aktivitu má také vliv přítomnost kyseliny salicylové připojené na aminocukernou jednotku, kdy navázaná kyselina salicylová v pozici C-1' výrazně zvyšuje biologickou aktivitu, což bylo ukázáno u hybridních linkosamidů připravených *in vitro*. Konkrétně se podařilo připravit nový linkosamid nazvaný CELIN a jeho demetylovaný analog ODCELIN (obr. 2), které obsahují APD podjednotku linkomycinu a aminocukernou jednotku z celesticetinu, včetně kyseliny salicylové (Kadlčík et al., 2017). Tyto dva hybridní linkosamidy a látky od nich odvozené se v současnosti testují a v budoucnu by mohly být využity jako léčiva (neveřejná data - ochrana duševního vlastnictví).

APD jednotka z linkomycinu A

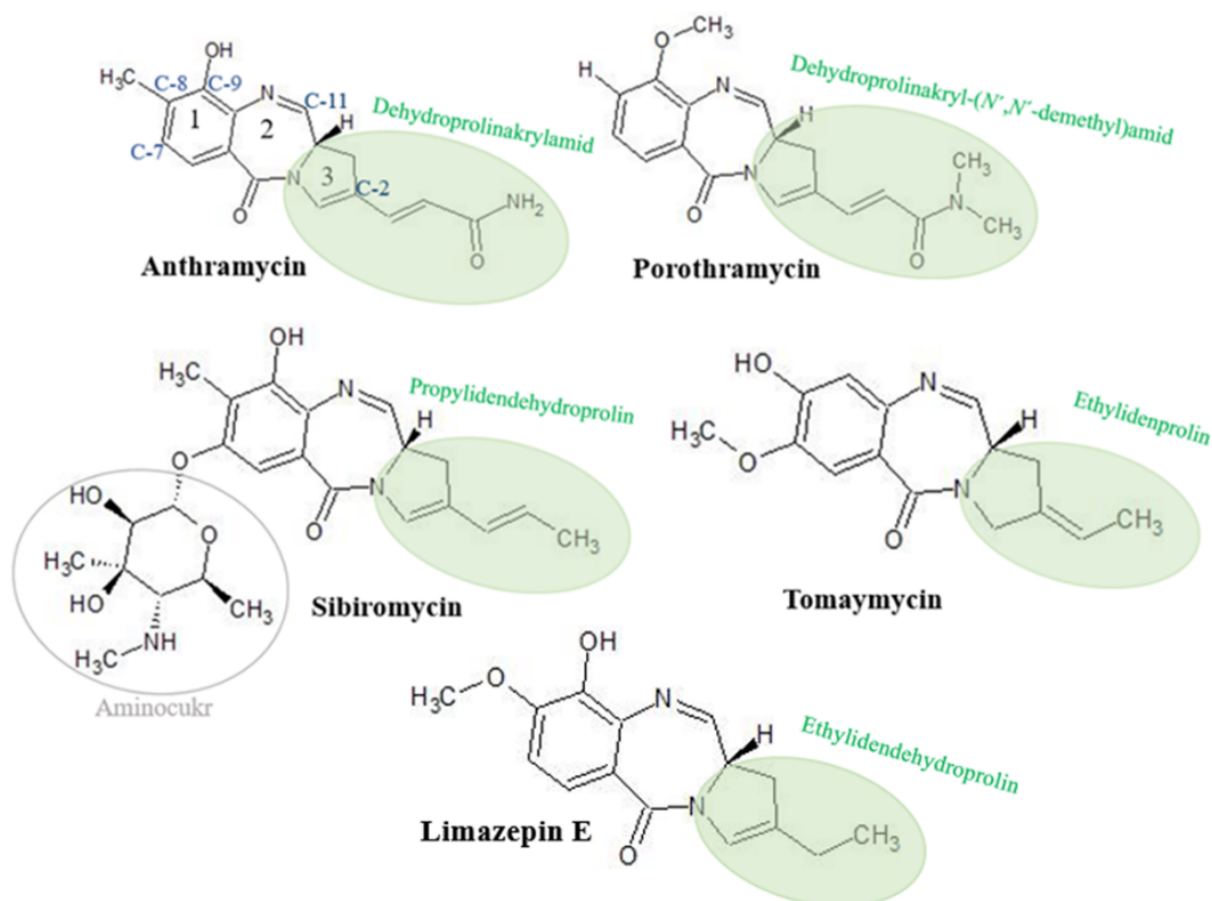


Obr. 2: Chemická struktura CELINu a ODCELINu - hybridních linkosamidů, v modrém kruhu je vyznačena APD část molekuly, která je totožná s APD u linkomycinu A, v šedém kruhu je vyznačena kyselina salicylová, která je připojena na aminocukernou podjednotku u celesticetinu.

2.1.2 Pyrrolo-1,4-benzodiazepiny (PBD)

PBD jsou látky skládající se ze tří kruhů - anthranilátového (1), diazepinového (2) a hydropyrrolového (3), přičemž jednotliví zástupci PBD se liší modifikacemi na diazepinovém a hydropyrrolovém kruhu (obr. 3). Hydropyrrolový kruh (3) může být výsledkem APD dráhy, nebo obsahuje proteinogenní L-prolin, podobně jako je tomu u linkosamidů.

Mezi popsané PBD s inkorporovaným APD patří anthramycin, sibiromycin, tomaymycin, limazepin E a porothramycin (obr. 3; shrnuto v Gerratana, 2012). Anthramycin byl první izolovaný PBD, jeho producentem je *Streptomyces refulvius* (Tendler & Korman, 1963), jako APD jednotku má ve své struktuře inkorporovaný dehydroprolinakrylamid (Leimgruber et al., 1965), na anthranilátovém kruhu má připojené dvě skupiny - v pozici C-8 methyl a v pozici C-9 hydroxyl. Strukturálně nejpodobnější PBD k anthramycinu je porothramycin produkovaný *Streptomyces albus* (Tsunakawa et al., 1988), jeho APD jednotkou je dehydroprolinakryl-(*N,N'*-demethyl)amid, tedy APD podjednotka obsahuje na rozdíl od anthramycinové místo dvou vodíků připojených na terminální dusík dvě methylové skupiny (Tsunakawa et al., 1988), substituenty na anthranilátovém kruhu se také liší, kdy v pozici C-8 porothramycin nemá navázaný žádný substituent a v pozici C-9 obsahuje methoxy skupinu. Sibiromycin, produkt *Streptosporangium sibiricum* (Brazhnikova et al., 1972), obsahuje jako APD propylidendehydroprolin (Mesentsev et al., 1974). Jeho anthranilátový kruh má stejně jako anthramycinový v C-8 pozici methyl a v C-9 má připojený hydroxyl, navíc má ještě substituent v pozici C-7 - jedná se o aminocukr 4-methylamino-4,6-dideoxy-3-*C*-methyl- β -*D*-altropyranosid. Tomaymycin, specializovaný metabolit *Streptomyces achromogenes* (Arima et al., 1972), obsahuje ve své struktuře jako APD podjednotku ethylidenprolin (Kariyone et al., 1971) a na anthranilátovém kruhu má v pozici C-7 navázaný methoxyl a v pozici C-8 hydroxyl. Limazepin E (dále jen „limazepin“), produkovaný *Micrococcus* ICBB 8177 (Fotso et al., 2009), obsahuje jako APD podjednotku ethylidendehydroprolin (Fotso et al., 2009). Chemickou strukturu má téměř totožnou s tomaymycinem, liší se pouze v pozici dvojnás vazby na APD podjednotce, kdy u limazepinu se nachází v prolinovém kruhu.



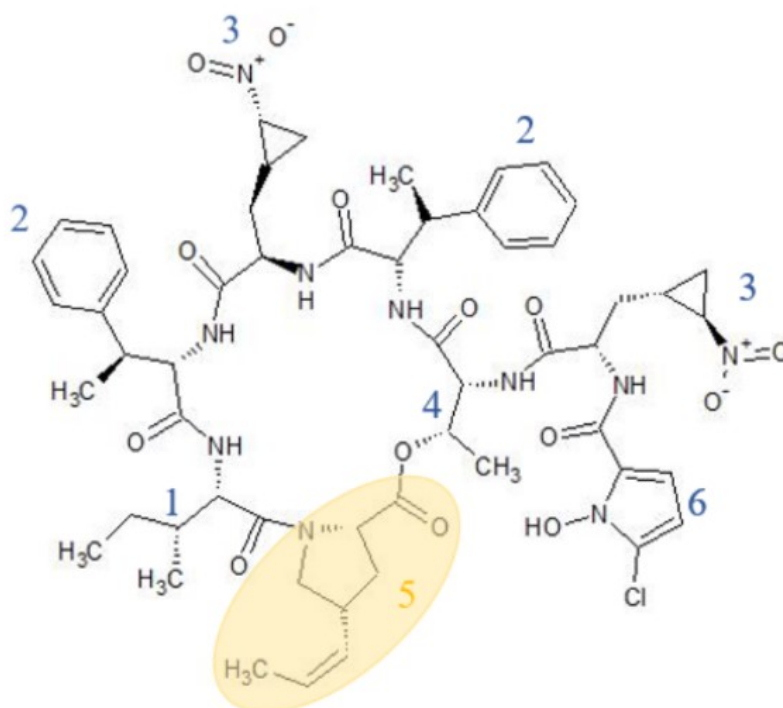
Obr. 3: Chemické struktury zástupců PBD inkorporující APD jednotku, v zeleném kruhu jsou vyznačené a pojmenované APD části molekul, čísla u anthramycinu jsou vyznačené základní kruhy PBD - 1 = anthranilátový, 2 = diazepinový, 3 = hydroxyprolinový, vyznačené jsou také uhlíky C-7, C-8 a C-9 anthranilátového kruhu, C-11 na diazepinovém kruhu a C-2 u hydroxyprolinového kruhu, u sibiromycinu je dále v šedém kruhu vyznačen připojený aminocukr.

PBD jsou látky se slabým antibakteriálním účinkem, významné jsou především pro své protinádorové účinky. Mechanismus účinku PBD spočívá v kovalentní vazbě C-11 PBD (obr. 3) na guanin v malém žlábků DNA (Kopka et al., 1994), brání tak nasednutí transkripčních faktorů (Kotecha et al., 2008).

Pro PBD, stejně jako pro linkosamidy platí, že látky s delším bočním alkylovým řetězcem na jednotce APD mají vyšší biologickou aktivitu (Thurston et al., 1999). Aktivitu také zvyšuje přítomnost dvojných vazeb na C-2 (Gregson et al., 2000). Protinádorová aktivita může být zvýšena či snížena za pomoci substituentů připojených na kružích, například oxo-skupina v pozici C-11 aktivitu snižuje (Hurley et al., 1976), naopak cukerná jednotka v pozici C-7 aktivitu zvyšuje (Thurston et al., 1999). Dosažení vyšší protinádorové aktivity lze u PBD docílit také spojením dvou molekul do dimeru přes C-7/C-7 (Farmer et al., 1991), nebo přes C-8/C-8 (Hartley et al., 2004).

2.1.3 Hormaomycin

Hormaomycin je depsipeptid, který se skládá z unikátních stavebních bloků obsahující aminokyseliny s cyklopropyl-, nitro- a chlor skupinami (obr. 4). Ve své struktuře má pouze jednu proteinogenní aminokyselinu - (*S*)-L-isoleucin (1), dále obsahuje dvě jednotky (*2S,3R*)-3-methyl-L-fenylalaninu (2), dvě jednotky (*1'R,2'R*)-3-(2'-nitrocyklopropyl)-L-alaninu (3), jednu jednotku (*R*)-*allo*-L-threoninu (4), jednu jednotku APD (*2S,4R*)-4-(*Z*)-propenyl-L-prolinu (5) a jednu 5-chloro-1-hydroxypyrollo-2-karboxylovou kyselinu (6), která ukončuje boční řetězec. Všechny části jsou spojeny esterovou nebo amidovou vazbou. Poprvé byl izolován ze *Streptomyces griseoflavus* (Omura et al., 1984).

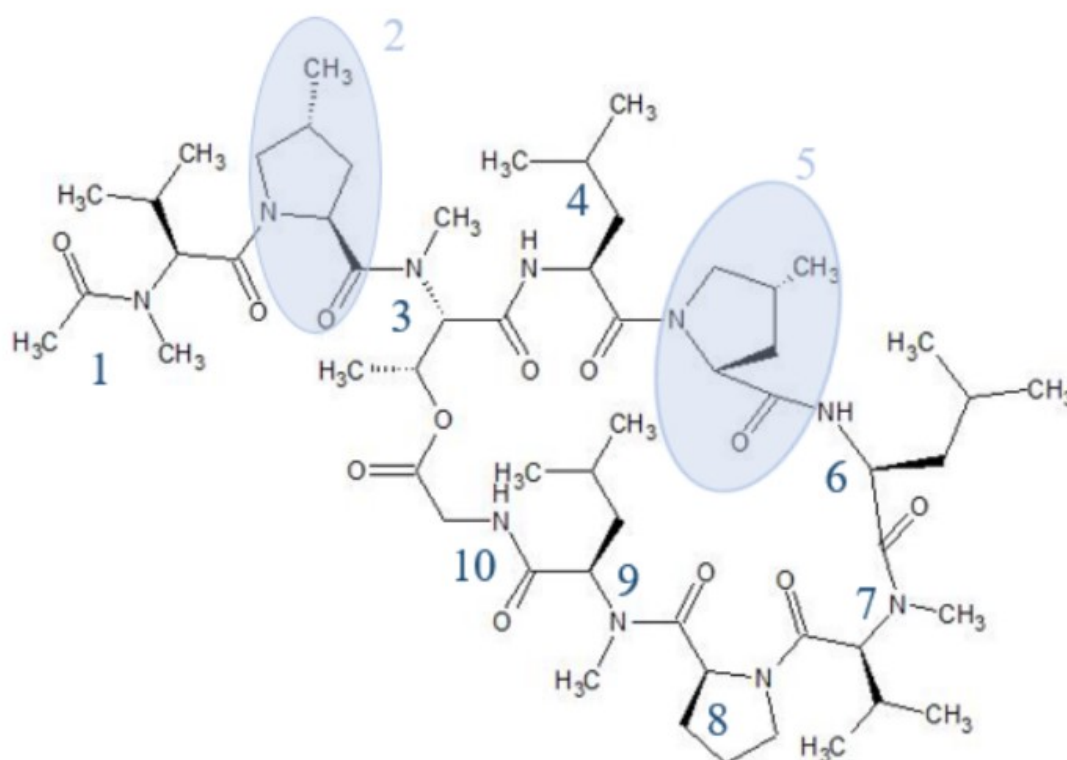


Obr. 4: Chemická struktura hormaomycinu, žlutě vyznačený je APD motiv, čísla jsou označeny jednotlivé části molekuly: 1 = (*S*)-L-isoleucin, 2 = (*2S,3R*)-3-methyl-L-fenylalanin, 3 = (*1'R,2'R*)-3-(2'-nitrocyklopropyl)-L-alanin, 4 = (*R*)-*allo*-L-threonin, 5 = (*2S,4R*)-4-(*Z*)-propenyl-L-prolin, 6 = 5-chloro-1-hydroxypyrollo-2-karboxylová kyselina.

Hormaomycin je unikátní molekula, která má antimikrobiální účinky, jedná se o úzkospektré antibiotikum, které zastavuje růst bakterií z rodu *Corynebacterium* (Andres et al., 1990). Zároveň jde o bakteriální hormon, který hraje roli v mezibuněčné signalizaci, indukuje morfologickou diferenciaci a také spouští produkci specializovaných metabolitů u některých druhů streptomycet. Hormaomycin také působí jako antimalarikum (Höfer et al., 2011). Jakým mechanismem přesně hormaomycin působí na bakteriální buňky, doposud nebylo zjištěno.

2.1.4 Griselimycin

Griselimycin je cyklický depsipeptid. Obsahuje celkem deset aminokyselin, v následujícím pořadí: *N*-methyl-L-valin (1), (*R*)-4-methyl-L-prolin (2), *N*-methyl-L-threonin (3), L-leucin (4), (*R*)-4-methyl-L-prolin (5), L-leucin (6), *N*-methyl-L-valin (7), L-prolin (8), *N*-methyl-D-leucin (9), L-glycin (10). *N*-methyl-L-threonin (3) a L-glycin (10) jsou vzájemně spojeny peptidovou vazbou. Peptidový řetězec je uzavřen esterovou vazbou mezi *C*-koncem L-glycinu a bočním řetězcem *N*-methyl-L-threoninu, což vede k uvolnění 1. a 2. aminokyseliny ze řetězce, které tak tvoří boční řetězec molekuly griselimycinu (obr. 5). Dvě z uvedených aminokyselin jsou výsledkem APD dráhy (2 a 5), zbylých osm aminokyselin je proteinogenních (Terlain & Thomas, 1971).



Obr. 5: Chemická struktura griselimycinu, modře vyznačené jsou APD stavební bloky, čísla jsou označeny jednotlivé části molekuly: 1 = *N*-methyl-L-valin, 2 = (*R*)-4-methyl-L-prolin, 3 = *N*-methyl-L-threonin, 4 = L-leucin, 5 = (*R*)-4-methyl-L-prolin, 6 = L-leucin, 7 = *N*-methyl-L-valin, 8 = L-prolin, 9 = *N*-methyl-D-leucin, 10 = L-glycin.

Griselimycin byl poprvé izolován v roce 1960 ze *Streptomyces* DSM 40835 (Terlain & Thomas, 1971). Spolu s griselimycinem se produkuje i malé množství methylgriselimycinu, který se strukturou odlišuje pouze v přítomnosti methylové skupiny na 8. aminokyselině (L-prolinu). V tomto případě je tato aminokyselina (4-methyl-L-prolin) také výsledkem APD dráhy.

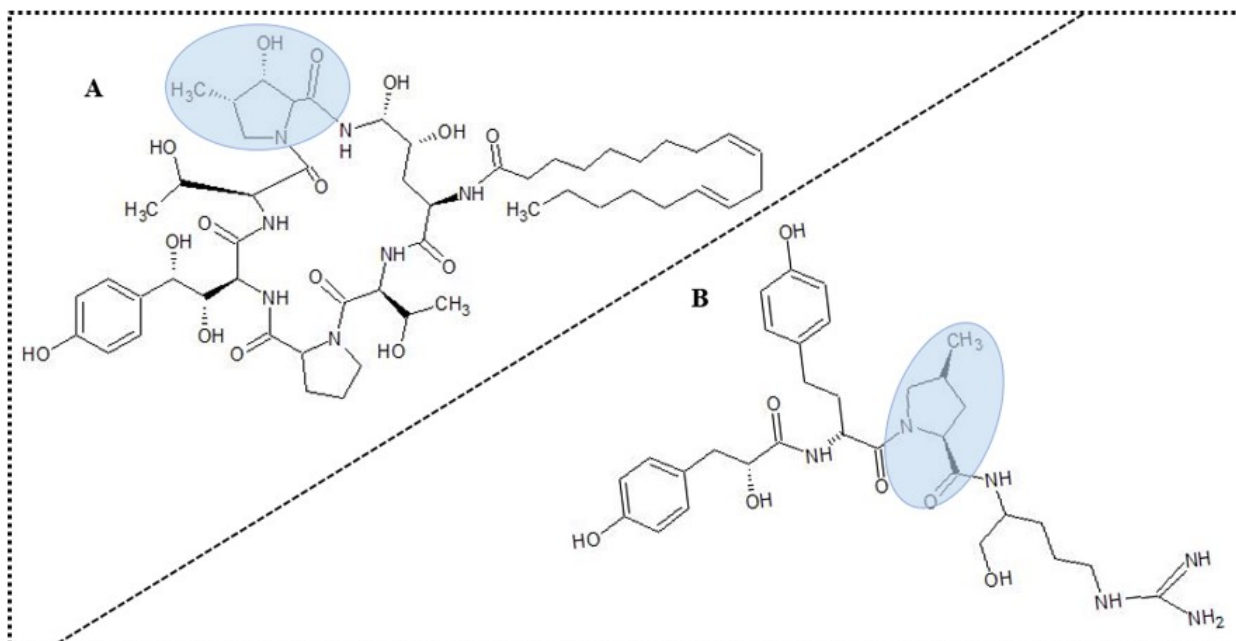
Griselimycin vykazuje specifické antibiotické účinky proti rodu *Mycobacterium*, u kterých se váže na svorkový protein DnaN, ten poté není schopen interagovat s DNA polymerasou, dochází tedy k inhibici replikace bakteriální DNA (Kling et al., 2015). Kvůli chemické nestabilitě a špatnému průniku do bakterií se v praxi nepoužívá, avšak modifikované molekuly griselimycinu se zdají být slibné alternativy s vylepšenými farmakokinetickými vlastnostmi. Mezi modifikace vylepšující vlastnosti griselimycinu patří například výměna L-prolinu za APD podjednotku či připojení ještě delšího alkylového řetězce právě na L-prolinovou jednotku (Kling et al., 2015).

2.1.5 APD v dalších aktinobakteriálních metabolitech

S využitím dvou různých bioinformatických přístupů byli recentně odhaleni doposud nepopsaní potenciální producenti nových APD látek a začíná být zřejmé, že APD motiv není v přírodě tak vzácný, jak se předpokládalo. Konkrétně se jednalo o sestavení sekvenčně-podobnostní sítě jednoho proteinu z linkomycinové APD dráhy (protein Apd6) v kombinaci s BLASTP analýzou (Steiningerová et al., 2020). Na základě těchto analýz byly identifikovány genomy nesoucí dosud necharakterizované BGS, které potenciálně kódují biosyntézu metabolitů obsahujících APD jednotku. Lze tedy předpokládat, že v blízké budoucnosti budou odhaleny nové, potenciálně zajímavé bioaktivní látky nesoucí APD motiv.

2.1.6 APD motiv mimo *Actinobacteria*

APD motiv byl doposud nalezen také u některých metabolitů produkovaných houbami a sinicemi (obr. 6). Na rozdíl od aktinobakteriálních APD metabolitů obsahují ve své struktuře výhradně APD motiv s 1C bočním řetězcem na C-4, mluvíme tedy o methylprolinových derivátech (Gademan et al., 2008). S aktinobakteriální APD dráhou (vedoucí k APD u intervencinu s 1C bočním řetězcem) mají společnou pouze výchozí molekulu, kterou je L-leucin, jinak je biosyntéza z pohledu biosyntetických enzymů zcela odlišná. Produktem hub s inkorporovaným APD motivem jsou například echinokandiny (obr. 6A; Nyfeler & Keller-Schierlein, 1974), u sinic to je například spumigin A (obr. 6B; Fujii et al., 1997).



Obr. 6: Chemická struktura A - echinokandinu B, B - spumiginu A jako zástupců metabolických produktů hub a sinic obsahující APD motiv (zvýrazněno v modrém kruhu).

2.2 Znaky BGS pro biosyntézu metabolitů s APD motivem u aktinobakterií

Pro metabolity s komplexní strukturou, tedy i pro metabolity obsahující APD, obecně platí, že geny kódující enzymy a pomocné proteiny určité biosyntetické dráhy se nachází v genových shlucích, aby mohly být transkribovány společně. Tyto shluky obsahují menší části nazývané podshluky, každý podshluk kóduje enzymy pro biosyntézu jednotlivého stavebního bloku/prekursoru, např. APD podshluk kóduje biosyntézu prekursoru APD. Podshluky jsou evolučně nezávislé jednotky, které byly v evoluci předávány mezi bakteriemi za pomoci horizontálního přenosu genů (Fischbach et al., 2008).

Je zřejmé, že během evoluce docházelo ke změnám v samotném APD podshluku, kdy mohlo dojít ke ztrátám či získům určitých oblastí a výsledkem jsou dráhy s menším či větším počtem enzymů. Z tohoto důvodu máme tak široké spektrum specializovaných metabolitů s inkorporovaným APD s různými modifikacemi (shrnutí v Janata et al., 2018). Různorodý je také kontext inkorporace APD prekursoru do finálního metabolitu, zatímco u PBD, hormaomycinu a griselimycinu se uplatňuje neribozomální peptidovou syntetasou (NRPS)-řízená kondenzace (Hu et al., 2007; Höfer et al., 2011; Lukat et al., 2017; Tesmar et al., 2017), u linkomycinu je zapojen neobvyklý kondenzační systém založený na NRPS- a mykothiol/ergothionen-závislých elementech (Zhao et al., 2015). Způsob, jakým je APD podjednotka do finálního metabolitu inkorporována a případně i dále modifikována (Kameník

et al., 2016; shrnuto v Gerratana, 2012) odráží i konkrétní genové složení BGS každého jednotlivého producenta.

2.2.1 BGS producenta linkomycinu se zaměřením na *apd* geny

BGS kódující biosyntézu specializovaného metabolitu obsahující APD motiv byl poprvé popsán u producenta linkomycinu (Peschke et al., 1995). BGS producenta linkomycinu nese biosyntetické geny označované jako *lmb*. Tyto geny kódují enzymy biosyntetické dráhy vedoucí k aminocukernému prekursoru, dále enzymy zajišťující biosyntézu prekursoru aminokyselinové části, enzymy zajišťující kondenzaci obou prekursorů včetně jejich následné modifikace a dále také proteiny zajišťující regulaci a proteiny udělující rezistenci (obr. 7; Koběřská et al., 2008).

Z hlediska této práce se text dále zaměřuje pouze na šestici genů kódujících biosyntézu aminokyselinového prekursoru linkomycinu - 4-propyl-L-prolinu (PPL; obr. 7; Koběřská et al., 2008). Podle předpokládaného pořadí jejich enzymových produktů v biosyntetické dráze (biosyntetickou dráhou se zabývá kapitola 2.3.2.1.) nesou obecnější označení *apd1* - *apd6* (tab. 1 - zahrnuta v kapitole 2.2.2). Analogicky jsou pojmenovány i jejich proteinové produkty, tedy Apd1 - Apd6 (shrnutu v Janata et al., 2018).

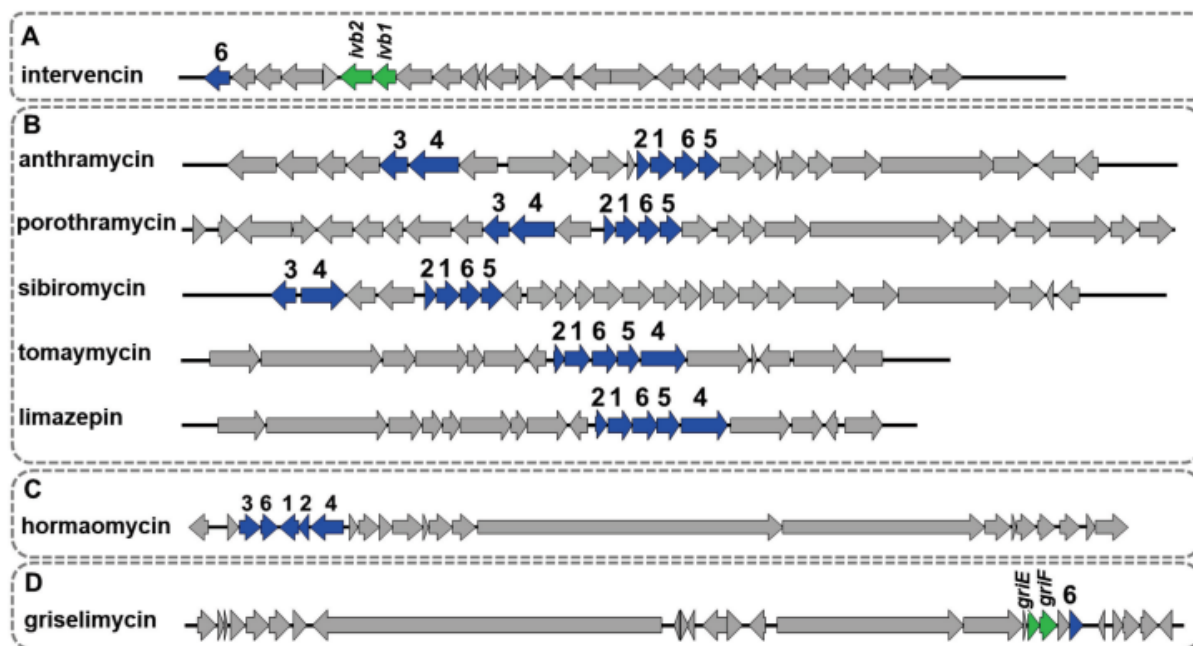


Obr. 7: BGS producenta linkomycinu - *Streptomyces lincolnensis*, modře označeny jsou *apd* geny (*apd1* - *apd6*; převzato a upraveno z Steiningerová, 2020a)

2.2.2 *Apd* geny v BGS producentů intervencinu, PBD, hormaomycinu a griselimycinu

Obecná terminologie „*apd* gen/y“ byla zavedena i u BGS producentů intervencinu, PBD, hormaomycinu a griselimycinu (shrnutu v Janata et al., 2018; Guzman et al., v přípravě), neboť homology jednoho až šesti zmíněných linkomycinových *apd* genů byly nalezeny i u producentů těchto

metabolitů (obr. 8 a tab. 1) (Hu et al., 2007; Li et al., 2009a; Li et al., 2009b; Guzman et al., v přípravě; Najmanová et al., 2014; Höfer et al., 2011; Lukat et al., 2017)



Obr. 8: BGS: A = producenta intervencinu , B = PBD, C = hormaomycinu a D = griselimycinu, modře vyznačené jsou *apd* geny, jednotlivá čísla odpovídají danému *apd* genu (tedy 1 = *apd1*), u griselimycinu a intervencinu jsou zeleně vyznačené *apd* nehomologní geny - *griE*, *griF*, *ivb1* a *ivb2*, (převzato z Steiningerová, 2020a).

Tab. 1: *Apd* geny kódující biosyntézu APD motivu u producentů linkomycinu, jednotlivých PBD, hormaomycinu, griselimycinu a intervencinu a jejich konkrétní názvy, modře vyznačené jsou specializované metabolity, v jejichž biosyntetickém genovém shluku se nachází pouze jeden *apd* (*apd6*) a dále dva *apd* nehomologní geny.

Jednotné označení genu	<i>apd1</i>	<i>apd2</i>	<i>apd3</i>	<i>apd4</i>	<i>apd5</i>	<i>apd6</i>	-	-
Linkomycin	<i>lmbB2</i>	<i>lmbB1</i>	<i>lmbW</i>	<i>lmbA</i>	<i>lmbX</i>	<i>lmbY</i>	-	-
Anthramycin (PBD)	<i>orf13</i>	<i>orf12</i>	<i>orf5</i>	<i>orf6</i>	<i>orf15</i>	<i>orf14</i>	-	-
Porothramycin (PBD)	<i>por14</i>	<i>por13</i>	<i>por10</i>	<i>por11</i>	<i>por16</i>	<i>por15</i>	-	-
Sibiromycin (PBD)	<i>sibU</i>	<i>sibV</i>	<i>sibZ</i>	<i>sibY</i>	<i>sibS</i>	<i>sibT</i>	-	-
Tomaymycin (PBD)	<i>tomI</i>	<i>tomH</i>	-	<i>tomL</i>	<i>tomK</i>	<i>tomJ</i>	-	-
Limazepin (PBD)	<i>lim11</i>	<i>lim10</i>	-	<i>lim14</i>	<i>lim13</i>	<i>lim12</i>	-	-
Hormaomycin	<i>hrmE</i>	<i>hrmF</i>	<i>hrmC</i>	<i>hrmG</i>	-	<i>hrmD</i>	-	-
Griselimycin	-	-	-	-	-	<i>griH</i>	<i>griE</i>	<i>griF</i>
Intervencin	-	-	-	-	-	<i>ivb3</i>	<i>ivb1</i>	<i>ivb2</i>

2.3 Biosyntéza aktinobakteriálních APD prekursorů

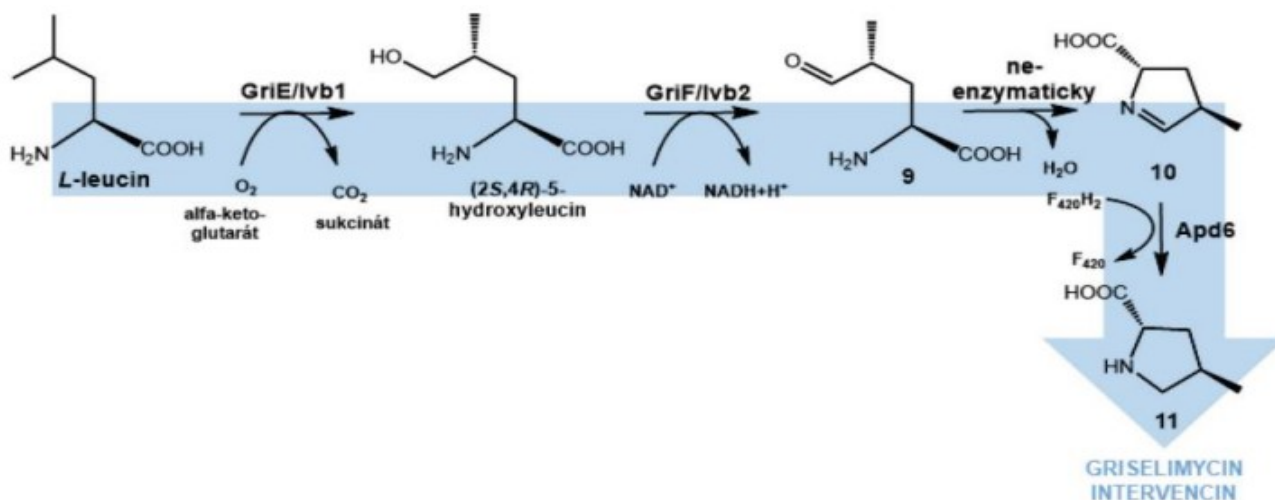
Pro všechny dosud popsané aktinobakteriální APD prekursory platí, že jejich biosyntéza začíná z L-tyrosinu (Hurley et al., 1975; Hurley et al., 1979; Witz et al., 1971), nebo z L-leucinu (Guzman et al., v přípravě; Lukat et al., 2017), nikoli z L-prolinu, jak by se na první pohled mohlo zdát ze struktury výsledné molekuly. Právě na základě výchozí molekuly biosyntetické dráhy u aktinobakterií rozlišujeme dvě biosyntetické dráhy - alkylprolinovou dráhu (APD dráha), která vychází vždy z L-tyrosinu a jejím výsledkem jsou APD prekursory, které mají na C-4 připojený boční řetězec dlouhý 2C nebo 3C. Tuto dráhu můžeme nalézt u producentů linkomycinu, anthramycinu, porothramycinu, sibiromycinu, tomaymycinu a hormaomycinu, BGS všech těchto producentů obsahuje 5-6 homologů *apd* genů (shrnutí v Janata et al., 2018). Druhou dráhou je methylprolinová dráha (MPL dráha), ta vychází z L-leucinu a výsledkem je vždy APD prekursor s 1C bočním řetězcem. MPL dráha se nachází u producentů griselimycinu (Lukat et al., 2017) a intervencinu (Guzman et al., v přípravě). BGS těchto producentů obsahuje pouze jeden *apd* homolog, konkrétně *apd6*, a dále pak dva *apd* nehomologní geny.

2.3.1 MPL dráha vycházející z L-leucinu

MPL dráha griselimycinu i intervencinu zahrnuje pouze tři enzymatické kroky (obr. 9). U griselimycinu byla dráha navržena na základě inaktivačních experimentů jednotlivých enzymů. Funkce všech tří enzymů byly následně prokázány *in vitro* a poté i *in vivo* (Lukat et al., 2017). Methylprolinová dráha griselimycinu začíná hydroxylací L-leucinu na (2*S*,4*R*)-5-hydroxyleucin za pomoci enzymu GriE patřící do 2-oxoglutarát-Fe^(II) oxygenasové rodiny. Produkt GriE je následně přeměněn za pomoci Zn-závislé dehydrogenasy GriF na (2*S*,4*R*)-4-methylglutamát-5-semialdehyd, tato látka ale není termodynamicky stabilní a podléhá samovolné cyklizaci na (2*S*,4*R*)-methyl- Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylovou kyselinu. Třetím a zároveň posledním enzymatickým krokem je redukce pomocí *apd6* homologu GriH na (2*S*,4*R*)-4-methyl-L-prolin, tedy finální produkt celé dráhy. Pro tuto redukci je nutná přítomnost kofaktoru F₄₂₀ a H₂ (Lukat et al., 2017).

Pro všechny tři enzymy MPL dráhy u intervencinu platí, že zatím u žádného z nich nebyla přímo prokázána jeho aktivita biochemicky, byly pouze provedeny sekvenční srovnání s enzymy z MPL dráhy griselimycinu. První enzym MPL dráhy u intervencinu se nazývá Ivb1 a s GriE sdílí na 48 % sekvenční identitu při pokrytí 99 %, druhý enzym - Ivb2 je homologní s GriF na 57 % při pokrytí 98 % a poslední enzym - Ivb3, s GriH sdílí na 45 % sekvenční identitu při pokrytí 97 %. Tato vysoká sekvenční homologie u všech tří párů enzymů naznačuje, že se jedná o enzymy se stejnou funkcí a MPL dráhy u

intervencinu i griselimycinu jsou velice podobné, obsahují analogické kroky a enzymatické reakce (Guzman et al., v přípravě).



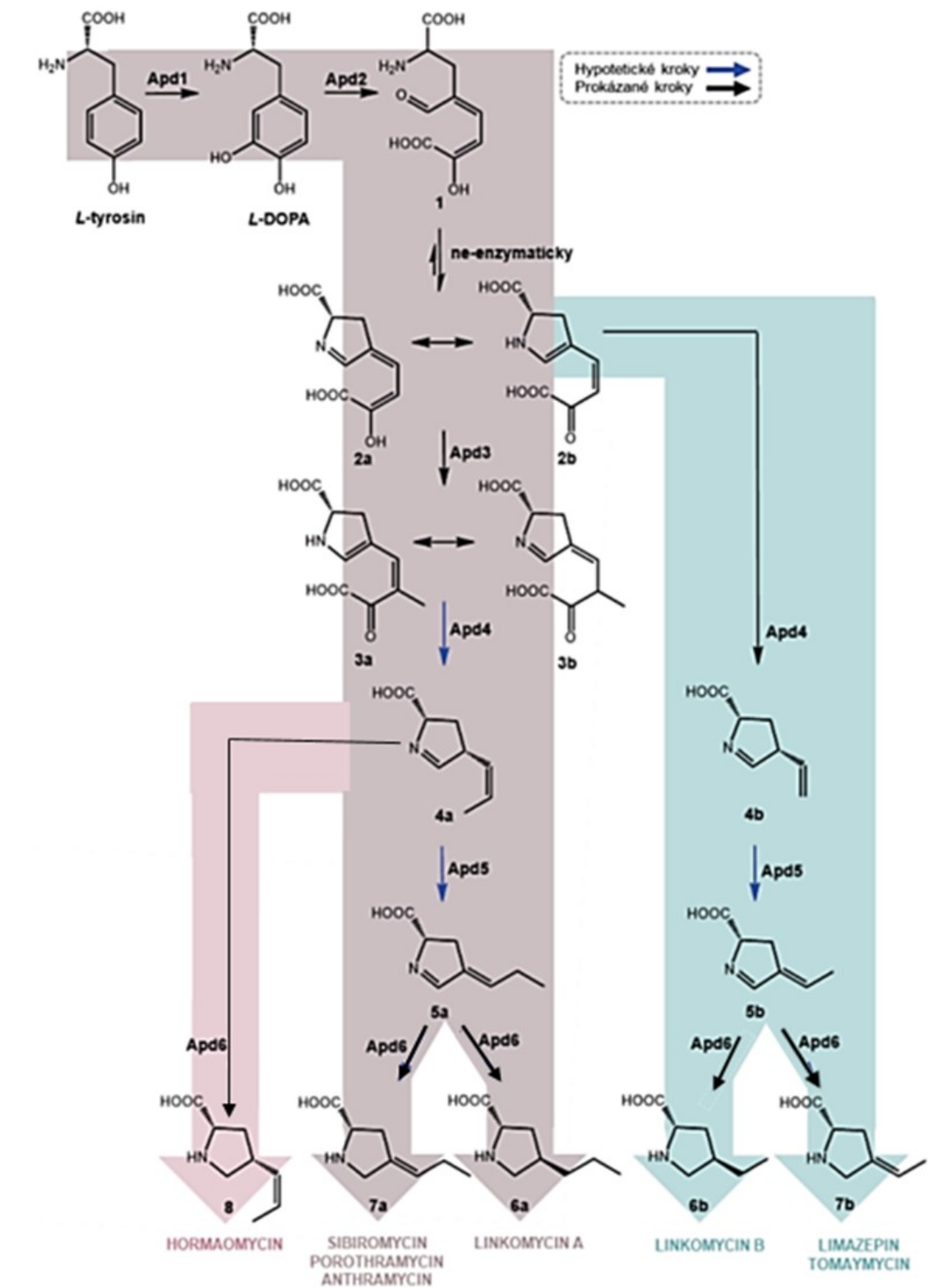
Obr. 9: MPL dráha vedoucí k biosyntéze 1C APD prekursoru griselimycinu a intervencinu, která vychází z L-leucinu a zahrnuje celkem tři enzymatické a jeden ne-enzymatický krok (převzato z Steiningerová, 2020a).

2.3.2 APD dráha vycházející z L-tyrosinu

APD dráha, která začíná L-tyrosinem je kódována 5-6 *apd* homologními geny. Všech šest Apd proteinů se účastní biosyntézy APD prekursoru linkomycinu (Peschke et al., 1995), anthramycinu (Hu et al., 2007), porothramycinu (Najmanová et al., 2014) a sibiromycinu (Li et al., 2009b). U tomaymycinu a limazepinu dráhu tvoří pět Apd proteinů, v BGS chybí *apd3* (Hu et al., 2007; Li et al., 2009a; Li et al., 2009b). U hormaomycinu se dráhy neúčastní Apd5 (Höfer et al., 2011).

Poprvé byla APD dráha popsána u producenta linkomycinu (Peschke et al., 1995), recentně byla dráha revidována dle nejnovějších poznatků (Jirásková et al., 2016; obr. 10). Prvním krokem APD dráhy je hydroxylace L-tyrosinu na L-3,4-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA) za pomoci L-tyrosin-3-hydroxylasy (= Apd1), která obsahuje hem b jako prostetickou skupinu (Connor et al., 2011; Neusser et al., 1998; Novotná et al., 2013).

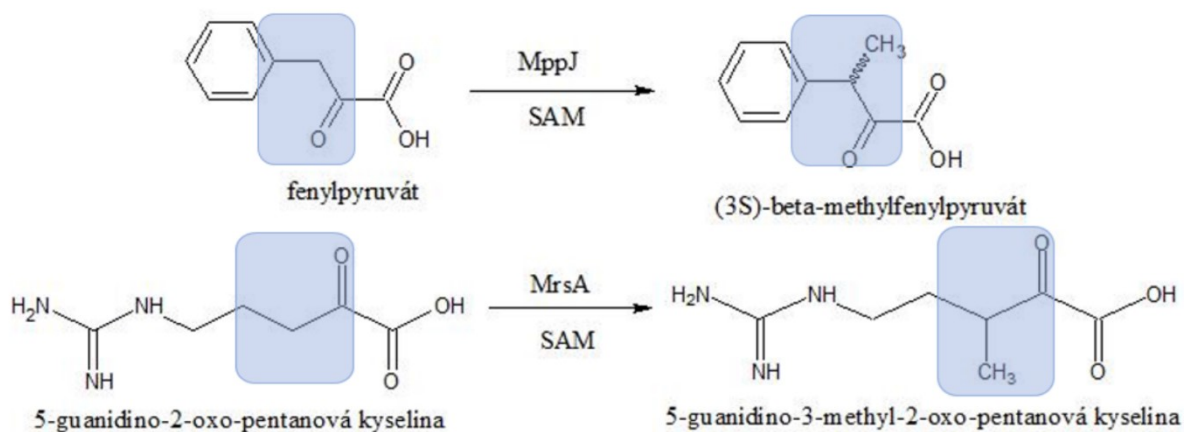
Ve druhém kroku se uplatňuje L-DOPA-2,3-dioxygenasa (= Apd2) patřící do rodiny jednodoménoých extradiolových dioxygenas typu I, která katalyzuje přeměnu molekuly L-DOPA na 2-oxokarboxylovou kyselinu (látka 1). Konkrétně Apd2 štěpí na molekule L-DOPA extradiol (Colabroy et al., 2008; Connor et al., 2011; Neusser et al., 1998; Saha et al., 2015), poté dochází k vlastní cyklizaci produktu, výsledkem je heterocyklická látka 2 (Novotná et al., 2004).



Obr. 10: Biosyntetická dráha prekursoru APD linkomycinu, PBD a hormao mycinu vycházející z L-tyrosinu, černé šipky označují prokázané kroky a modré šipky hypotetické kroky (převzato a upraveno z Steiningerová, 2020a).

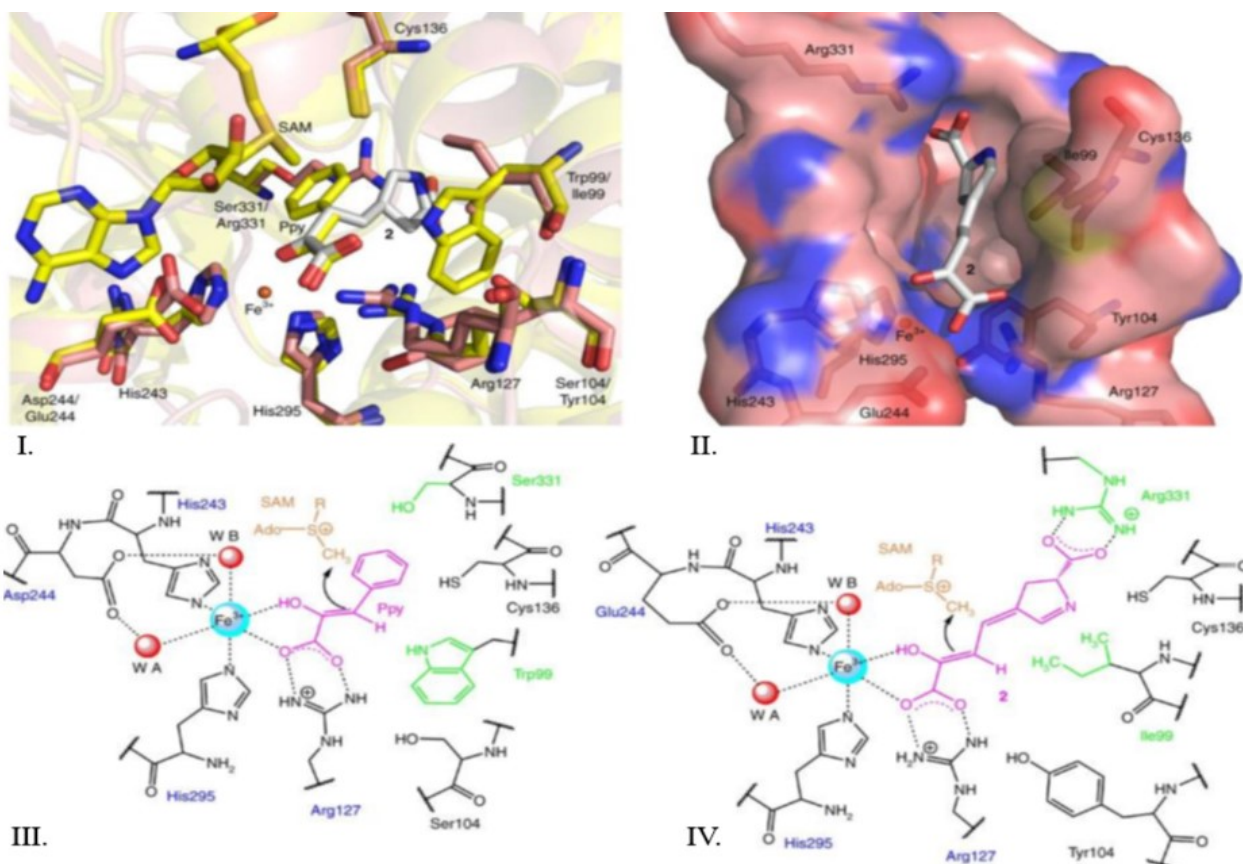
Pořadí dalších dvou enzymů a jejich reakcí je stále předmětem vědeckých diskusí (Kameník et al., 2018; Zhong et al., 2018), konkrétně se jedná o C-methylaci katalyzovanou SAM-závislou methyltransferasou (SAM-MT = Apd3) a reakci katalyzovanou neobvyklým enzymem Apd4. Funkce Apd3 z biosyntézy APD prekursoru linkomycinu (protein LmbW) jako C-methyltransferasy byla prokázána experimentálně *in vitro*, kdy v přítomnosti SAM byla látka **2** přeměněna na látku **3**, jejíž identita byla prokázána identifikací její přesné hmoty (Jirásková et al., 2016). Nicméně Zhong a kol. zároveň prokázali neobvyklou hydrolasovou aktivitu Apd4 z biosyntézy anthramycinu (protein Orf6), který štěpí C-C vazbu (Zhong et al., 2017), v *in vitro* reakci, kde byla jako substrát použita taktéž látka **2** - ta je ale v revidovaném schématu dle Jirásková et al. navržena jako přirozený substrát Apd3, případně substrát Apd4, ale pouze v případě, má-li výsledný APD prekursor 2C v bočním řetězci.

Doposud byly funkčně charakterizovány dva homologní proteiny k LmbW. Prvním charakterizovaným homologem je MrsA z biosyntézy rostlinného toxinu 3-methyl-argininu, s LmbW má na 26 % shodnou sekvenci při pokrytí 80 % (Braun et al., 2010). Druhým homologem je MppJ účastnící se biosyntézy antibiotik manopeptinomycinů, vykazuje 27% sekvenční homologii s LmbW při pokrytí 84 % (Huang et al., 2009). Substráty obou homologů - 5-guanidino-2-oxo-pentanová kyselina (MrsA) a fenylpyruvát (MppJ) nesou podobné strukturální charakteristiky v místě methylace (obr. 11) jako látka **2**, předpokládaný přirozený substrát LmbW, což nepřímou podporuje hypotézu, že methylací krok předchází kroku štěpícímu C-C vazbu.



Obr. 11: Reakce katalyzované proteiny MppJ a MrsA. Modře podbarvená jsou místa, kde dochází k methylaci (převzato a upraveno z Braun et al., 2010; Huang et al. 2009)

Další podpůrný důkaz tvrzení, že methylace předchází štěpení C-C vazby, lze nalézt v homologním modelu LmbW (obr. 12), založeném na známé struktuře MppJ (Zou et al., 2014; Kameník et al., 2018). Z modelu je zcela evidentní vysoká podobnost obou proteinů, zejména v okolí aktivního místa. Konkrétně aktivní místa obou proteinů obsahují konzervované aminokyselinové zbytky - H243, H295, D/E244, které jsou důležité při vazbě nehemového Fe³⁺, který spolu s R127 fixuje α -oxo-karboxylových částí substrátů obou proteinů. V modelu LmbW byl navíc ještě identifikován R331, který se bude pravděpodobně účastnit fixace druhé karboxylové skupiny substrátu **2** (Kameník et al., 2018).



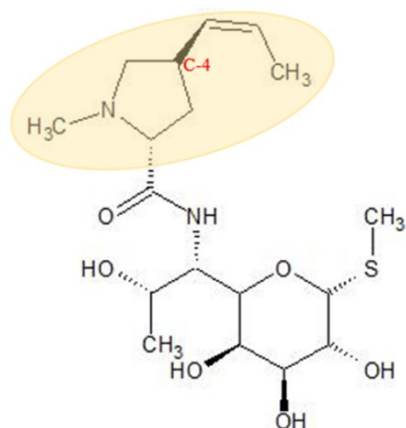
Obr. 12: I. = krystalová struktura MppJ s navázaným substrátem (Ppy = fenylpyruvát) a kofaktorem (SAM) - žlutě, překryvný model s LmbW (růžově) a jeho substrátem (bíle), II. = homologní model místa vzájemícího substrát LmbW, III. = znázornění aktivního místa MppJ, IV. = znázornění aktivního místa LmbW, tmavě modře - konzervované aminokyselinové zbytky (převzato a upraveno z Kameník et al., 2018).

LmbA (Apd4 z biosyntézy APD prekursoru linkomycinu) spolu se všemi ostatními Apd4 homology je sekvenčně podobný γ -glutamyltranspeptidasam, ty patří do větší skupiny *N*-terminálních nukleofilních hydrolas, pro které je typická jejich autoproteolytická aktivace, kdy dochází k uvolnění katalytického zbytku na jeho *N*-konci. Tato odštěpená část se dále chová jako nukleofil a hydrolyzuje amidovou vazbu na substrátu (shrnuto v Castellano & Merlino, 2012). Mechanismus neobvyklé β -eliminací reakce, který Zhong pro Apd4 navrhuje, byl v korespondenci zpochybněn, neboť dostatečně nevysvětloval posun elektronů v sp^2 valenční vrstvě C-atomu (posun při klasické β -eliminaci nastává v sp^3 valenční vrstvě) a zároveň byl navržen nový mechanismus, který tento posun vysvětluje a je aplikovatelný na látku **3**, tedy původně navržený substrát Apd4 proteinů v biosyntéze APD s 3C v bočním řetězci (Kameník et al., 2018).

Přesto, že výše uvedené nepřímé důkazy podporují hypotézu, že látka **2** je spíše přirozeným substrátem Apd3 než Apd4, a tedy reakce katalyzovaná Apd3 tak předchází štěpení katalyzované Apd4,

diskuze o pořadí těchto biosyntetických kroků stále nemůže být bez přímého důkazu uzavřena. Spolehlivým způsobem identifikace přirozeného substrátu tak zůstává krystalografická analýza jednoho či obou proteinů, která by odhalila přesnou vazbu substrátu v aktivním místě proteinu. Položením základu, který povede k objasnění struktury jednoho z proteinů - Apd3 proteinu LmbW, se zabývá první část této práce, methyltransferasami obecně se proto dále detailněji zabývá kapitola 3.

Předpokládá se, že pátou reakcí je posun dvojných vazeb do konjugace umožňující poslednímu enzymu dráhy jejich redukcí. Tato reakce je pravděpodobně katalyzována homologními enzymy Apd5, které jsou sekvenčně podobné isomerasám z rodiny PhzC-PhzF. Existuje zatím pouze jeden funkčně charakterizovaný protein z této rodiny - jedná se o isomerasu PhzF z *Pseudomonas fluorescens* (Blankenfeldt et al., 2004). Isomerasová aktivita Apd5 proteinů je dále podporována produkčním profilem mutantního kmene *Streptomyces lincolnensis* $\Delta lmbX$, který jako majoritní produkt produkuje dehydrolinkomycin A (obr. 13), tedy metabolit inkorporující APD prekursor s jednou dvojnou vazbou uprostřed bočního alkylového řetězce (chybějící isomerační reakce umožní v následujícím kroku redukcí pouze endocyklické dvojně vazby substrátu) - analogicky je tomu i u hormaomycinu, biosyntéza APD prekursoru hormaomycinu totiž také nezahrnuje isomerační krok, homolog *apd5* v BGS producenta hormaomycinu chybí (Höfer et al., 2011) Enzymová aktivita žádného Apd5 homologu nebyla doposud prokázána biochemicky.

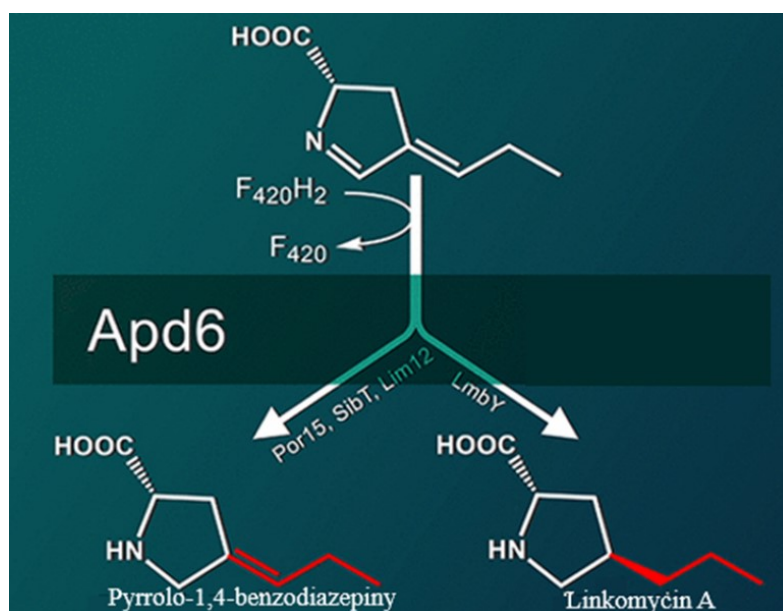


Obr. 13: Chemická struktura dehydrolinkomycinu A (majoritního produktu mutantního kmene *S. lincolnensis* $\Delta lmbX$), v oranžovém kroužku je zvýrazněna APD podjednotka, od linkomycinu se liší přítomností dvojně vazby uprostřed bočního alkylového řetězce APD podjednotky vycházejícího z C-4.

Poslední, tedy šestý krok APD dráhy je katalyzován $F_{420}H_2$ -závislými oxidoreduktasami, označovanými jako Apd6 a produkty těchto reakcí jsou zároveň finálními produkty celé konkrétní APD dráhy (Peschke et al., 1995; shrnuto v Janata et al., 2018). Funkce Apd6 byla prokázána experimentálně pomocí kultivace *Streptomyces lincolnensis* UC8292, u tohoto kmene byla přerušena syntéza kofaktoru F_{420} , následně byl z média vyizolován meziprodukt **5a** (Kuo et al., 1992), tedy substrát LmbY (Apd6 z biosyntézy linkomycinu). Dalším důkazem funkce LmbY je hromadění meziproduktu **5a** v kultivačním médiu u mutantního kmene *Streptomyces lincolnensis* s delecí genu *lmbY* (Jirásková et

al., 2016). Jednoznačným důkazem funkce Apd6 proteinů, včetně závislosti na kofaktoru F₄₂₀, bylo jejich nedávné testování oxidoredukční aktivity *in vitro* (Steiningerová, 2020a).

Zajímavé u Apd6 homologů je jejich rozdílná reakční specifita (obr. 14), kdy můžeme dle tohoto „kritéria“ zjednodušeně rozdělit Apd6 do dvou skupin. Substráty obou skupin vypadají analogicky a důležitá u nich je přítomnost dvou dvojných vazeb v konjugaci. První skupina Apd6, reprezentovaná prozatím jediným zástupcem - LmbY (linkomycin), je schopna redukovat obě dvojně vazby, výsledkem je tedy plně satureovaný produkt. Druhá skupina Apd6, kam můžeme zařadit například Por15 (porothramycin), je schopna redukovat pouze jednu dvojnou vazbu a výsledkem je tedy mono-nenasycený produkt. Pro úplnost, byl popsán i protein (GriH, Apd6 z biosyntézy griselimycinu), katalyzující redukci oběma směry - výsledkem je pak směs nasyceného a mono-nenasyceného produktu (Steiningerová et al., 2020). Objasnění molekulárního základu neobvyklé rozdílné reakční specifity Apd6 homologních proteinů je druhou částí této práce, proto se rodině proteinů, kam se Apd6 řadí, a také neobvyklému kofaktoru F₄₂₀ obecně věnuje kapitola 4.



Obr. 14: Rozdílná reakční specifita biochemicky testovaných Apd6 homologů - Por15, SibT, Lim12 (Apd6 z biosyntézy APD podjednotky PBD - porothramycinu, sibiromycinu a limazepinu) a LmbY (Apd6 z biosyntézy prekursoru APD podjednotky linkomycinu) mají totožný substrát, ovšem výsledný produkt se liší v nasycenosti vazeb bočního alkylového řetězce APD podjednotky - zvýrazněno červeně (převzato a upraveno z Steiningerová et al., 2020).

3. Methyltransferasy

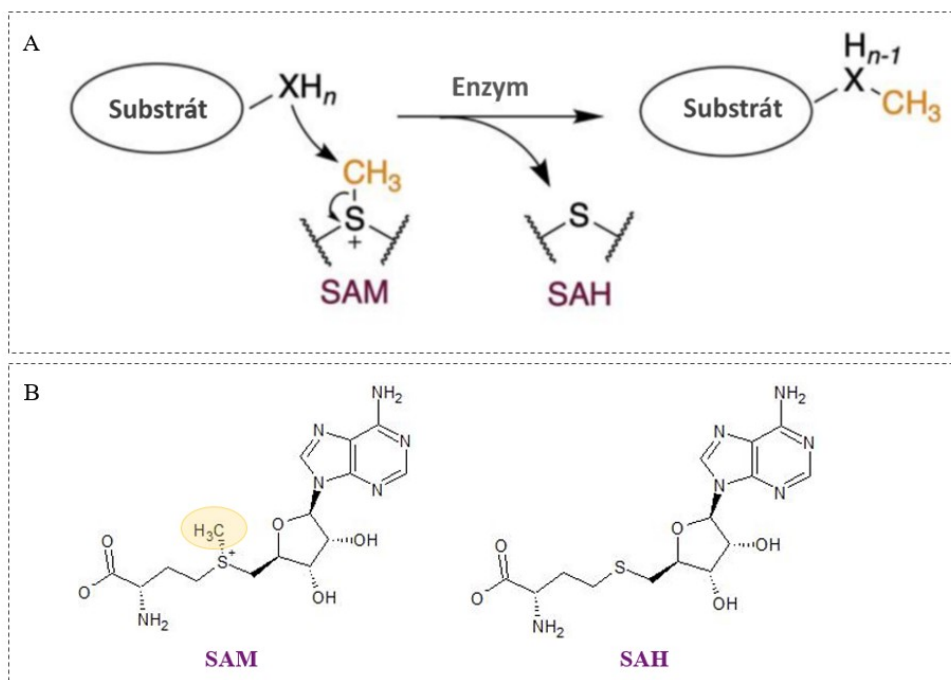
Methyltransferasy (MT) tvoří velkou rodinu enzymů vyskytujících se u všech tří domén živých organismů. Mohou přeměňovat různé substráty, například proteiny (Ambler & Rees, 1959), DNA (Holliday & Pugh, 1975) či RNA (Reid et al., 1999). Hrají důležitou roli v mnoha biologických procesech v buňkách, hlavně co se týká udržování homeostáze. MT jsou také důležité při buněčné signalizaci či v biosyntéze mnoha různých centrálních i specializovaných metabolitů (shrnuje v Liscombe et al., 2012).

Největší a nejvýznamnější skupinu MT tvoří SAM-MT, které využívají SAM, v buňce běžně dostupnou molekulu, jako donor methylové skupiny v enzymatické reakci, kterou katalyzují (shrnuje ve Struck et al., 2012).

3.1 SAM-závislé methyltransferasy - Apd3

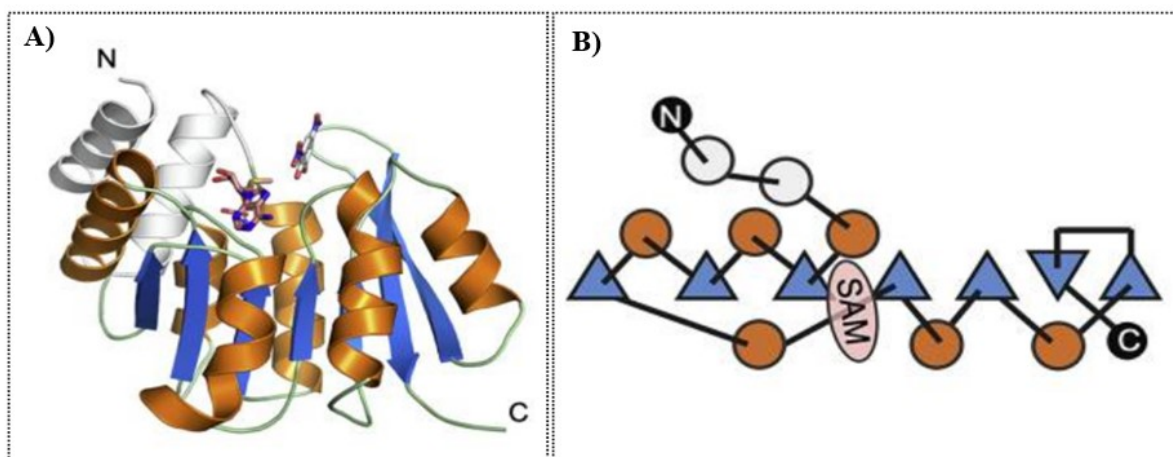
SAM-MT mají velkou variabilitu struktur i funkcí, mohou dokonce přenášet i jiné skupiny než methyl a tedy jako kofaktor používat i různé analogy SAM (shrnuje ve Struck et al., 2012). SAM-MT mohou být rozděleny do menších skupin podle jejich substrátové specifity (malé molekuly, lipidy, proteiny, nukleové kyseliny atd.), nebo podle toho, na jaký atom substrátu připojují donorovou skupinu (shrnuje v Martin & McMillan, 2002). Methylace za pomoci SAM probíhá na nukleofilních atomech substrátu, tedy například na dusíku, kyslíku, uhlíku, síře nebo selenu.

Jeden z hlavních mechanismů reakcí katalyzovaných SAM-MT je tzv. methylace S_n2 typu (obr. 15), methyl na molekule SAM je připojen k atomu síry, ta je kladně nabitá a proto může dojít k elektrofilnímu ataku dvojně vazby na substrátu a snadnému odštěpení a přenosu tohoto methylu na substrát. Při odštěpení methylové skupiny ze SAM vzniká *S*-adenosyl-L-homocystein (SAH) (shrnuje v O'Hagan & Schmidberger, 2010). Právě methylace S_n2 typu se předpokládá u reakcí katalyzovaných Apd3 proteiny (Kameník et al., 2018).



Obr. 15: A - Schématické zobrazení methylace typu S_n2 u SAM-MT, kdy dochází k přenesení methylu z molekuly SAM na substrát, který zároveň přijde o jeden vodík. B - Chemické struktury *S*-adenosyl-L-methioninu (SAM) s vyznačeným methylem (donor) a *S*-adenosyl-L-homocysteinu (SAH; převzato a upraveno ze Sun et al., 2021).

Apd3 homologní proteiny se na základě předpokládaných strukturních znaků řadí mezi SAM-MT I. třídy (dle nástroje BLAST). Při porovnání primárních sekvencí zástupců MT třídy I. se může zdát, že se jedná o úplně jiné enzymy a nevykazují téměř žádnou sekvenční homologii, ovšem při porovnání 3D struktur jsou si velice podobné. 3D struktura MT třídy I. je evolučně konzervovaná pro vazbu SAM a také pro stejný mechanismus katalýzy (shrnutí v Martin & McMillan, 2002). Konkrétně pro tuto třídu je typický motiv Rossmanova foldu (obr. 16) - jedná se o sedm β -listů a sedm α -helixů, které dohromady tvoří dvojité vnutřené otevřené $\alpha\beta$ sendvič. Pro vazbu kofaktoru SAM je důležitý na glycin bohatý motiv na prvním β -listu - GxG nebo GxGxG a dále konzervované kyselé aminokyselinové zbytky na konci druhého β -listu. *N*-konec Rossmanova foldu je flexibilní a rozeznává substrát (shrnutí v Struck et al., 2012).



Obr. 16: A - 3D model jádrových domén třídy I. MT, B - topologický diagram jádrových domén třídy I. MT - motiv Rossmanova foldu se sedmi β -listy a sedmi α -helixy, vyobrazeny jsou také N a C-konce motivu a místo vazby kofaktoru SAM (převzato a upraveno ze Sun et al., 2021).

3.1.1 SAM-MT - využití v biotechnologiích

Význam SAM-MT v biotechnologickém průmyslu tkví hlavně v biokatalýze, syntetické biologii a také ve značení molekul za pomoci methylové skupiny (shrnuto v Struck et al., 2012). Jedním z hlavních důvodů, proč se o SAM-MT, ale i obecně o MT zajímáme v rámci biokatalýzy, je změna fyziologických i biologických vlastností biologicky aktivních molekul při přidání methylové skupiny do jejich struktury (shrnuto v Barreiro et al., 2011). Zlepšení vlastností a zvýšení biologické aktivity určitých molekul se nejvíce využívá při vývoji nových léčiv. Mezi vylepšené vlastnosti biologicky aktivních molekul po jejich methylaci patří například zvýšení jejich rozpustnosti v tucích (lipofilicita) a s tím související snazší přechod přes biologické membrány do buněk, díky čemuž se zvýší i jejich dostupnost v organismu (shrnuto v Schönherr & Cernak, 2013). Další zlepšení vlastností se týká větší ochrany před degradací buněčnými enzymy (shrnuto v Struck et al., 2012).

Methylace využívající enzymy (biologická / enzymatická methylace) má na rozdíl od chemické (neenzymatické) methylace mnoho výhod - pro chemickou methylyaci se používá methyljodid (CH_3I) a pro přenos methylové skupiny na substrát jsou vyžadované extrémní podmínky, celý proces je také poměrně neekologický a výtěžky jsou nízké, u reakce navíc chybí stereo- i regiosektivita (shrnuto v Struck et al., 2012). Regio- a stereosektivita methylačních reakcí je důležitá, protože u některých látek mohou být určité isoformy toxické, za pomoci nově objevených SAM-MT můžeme danou látku biosyntetizovat ve větším množství i čistotě a bez nechtěných isoform (shrnuto v Zhang et al., 2021).

Některé SAM-MT mají poměrně širokou reakční specifitu a mohou methylovat i molekuly, které nejsou jejich přirozeným substrátem, dále mohou také přenášet různé alkylové skupiny, které jsou navázané na synteticky připravené analogy SAM, například SAM-MT CouO (z biosyntézy

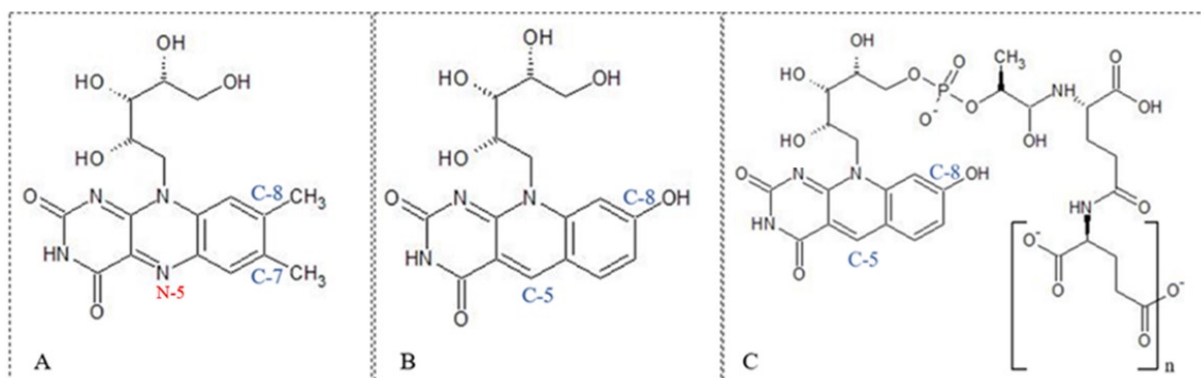
coumermycinu A1) a NovO (z biosyntézy novobiocínu) jsou schopné přenášet allylové, propargylové a benzylové skupiny (shrnutu v Barreiro et al., 2011). SAM-MT mohou být také využity v metabolickém inženýrství, kdy za pomoci methylace centrálních či specializovaných metabolitů mohou vznikat úplně nové produkty (shrnutu v Struck et al., 2012).

LmbW (SAM-MT z biosyntézy APD jednotky linkomycinu) se zdá být z pohledu biokatalýzy vhodným kandidátem pro budoucí použití v biotechnologickém průmyslu, neboť se jedná o enzym se širokou substrátovou specifitou (Kameník et al., 2018; Zhong et al., 2018), který je navíc schopen přenášet i delší alkylové řetězce, než jen methyl (nepublikovaná data).

4. Kofaktor F_{420} ve specializovaném metabolismu aktinobakterií

4.1 Deazaflavinový kofaktor F_{420}

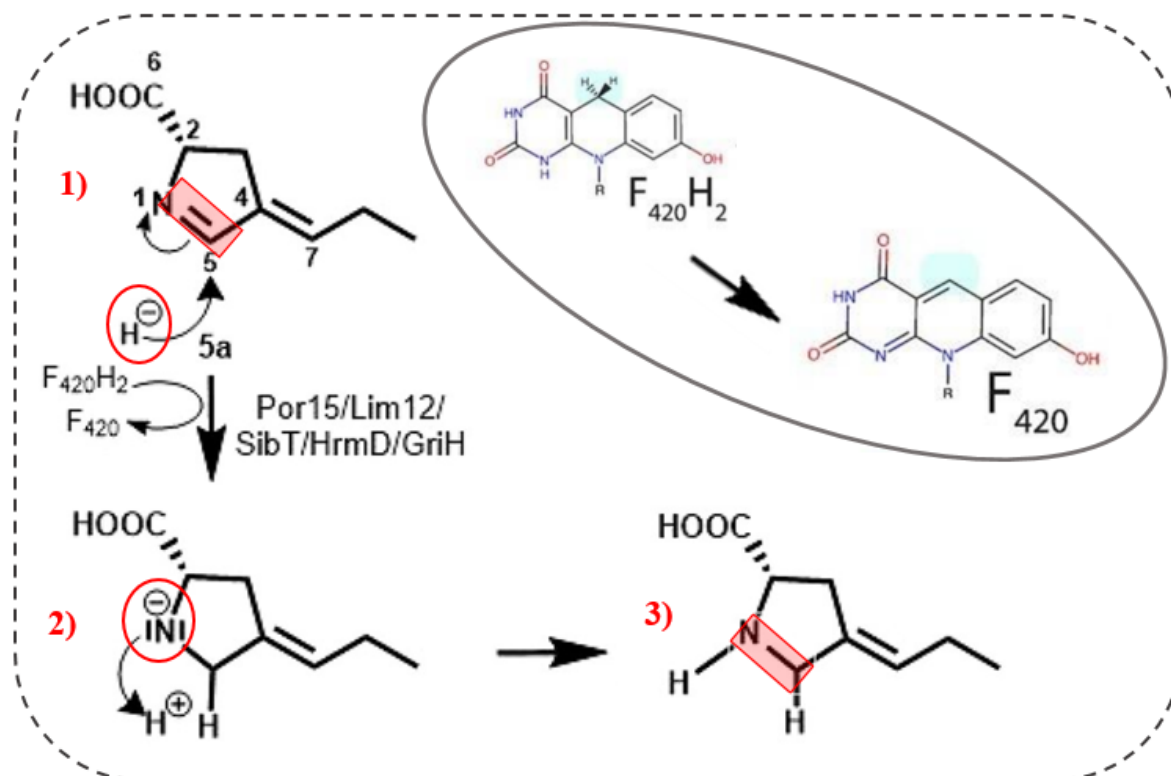
F_{420} spolu s F_0 patří mezi tzv. deazaflavinové kofaktory, které mají velice podobnou strukturu jako flavinové kofaktory - flavinadenindinukleotid (FAD) nebo flavinmononukleotid (FMN). FMN a FAD se nachází u všech tří domén života a jejich společným prekursorem je riboflavin (vitamín B2; obr. 17A; shrnutu v Greening et al., 2016). Základem jejich chemické struktury je isoalloxazinový kruh se dvěma methyly jako substituenty v pozici C-7 a C-8, redoxně aktivní místo kruhu se nachází v pozici N-5. Deazaflavinové kofaktory obsahují isoalloxazinový kruh, který má ale místo N-5 (jak tomu je u flavinů) uhlík, dále jim chybí methyly v pozici C-7 a C-8, v pozici C-7 není žádný substituent a v pozici C-8 se nachází hydroxylová skupina (obr. 17B a 17C). F_0 je 7,8-didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin a F_{420} je po chemické stránce laktyloligoglutamátfosfodiesterový derivát F_0 . Počet navázaných glutamátových zbytků u F_{420} je druhově specifický, u methanogenních *Archaea* bez cytochromů se nachází 2-3 glutamátové zbytky (Gorris & Drift, 1994), u methanogenních *Archaea* mající cytochromy to je 4-5 (Gorris & Drift, 1994) a nejvíce se jich nachází u mykobakterií a to 5-7 (Bair et al., 2001).



Obr. 17: Porovnání chemických struktur: A - riboflavinu jako reprezentace flavinových kofaktorů (s modře vyznačenými C-7 a C-8 a červeně vyznačeným redoxním místem - N-5), B - kofaktoru F_0 a C - kofaktoru F_{420} (u kterých je modře vyznačen C-5 = redoxní místo, C-8), závorka ohraničuje glutamátový zbytek - $n = 2-7$ (převzato a upraveno z Greening et al., 2016).

Na rozdíl od F_0 , který je spíše považován za chromofor než kofaktor a jeho distribuce není taxonomicky omezena, F_{420} je kofaktor, který plní mnoho funkcí a zároveň je taxonomicky značně omezen (shrnuto v Greening et al., 2016). Objeven byl nejprve u methanogenních *Archaea* (Cheeseman et al., 1972), později se jeho přítomnost prokázala i u dalších skupin taxonu *Euryarcheota*, například u síran redukujících *Archaea* (Stetter et al., 1987), nebo u halofilních *Archaea* (Lin & White, 1986). F_{420} se také nachází v doméně *Bacteria*, konkrétně ve skupině *Actinobacteria* (Daniels et al., 1985) a poměrně nedávno byl tento kofaktor objeven také u zástupců skupin *Chloroflexi*, *Proteobacteria* a *Firmicutes* (Ney et al., 2017) a to na základě detekce genů, které kódují jeho biosyntézu. F_{420} hraje roli v přeměnách exogenních substrátů nebo endogenních metabolitů mykobakterií a streptomycet - u těchto dvou skupin se také účastní detoxifikačních procesů (Taylor et al., 2010; shrnuto v Greening et al., 2016).

Mechanismus redukce substrátu (konkrétně substrátu Por15/Lim12/SibT/HrmD/GriH) kofaktorem $F_{420}H_2$ (redukována forma) je založen na prvotním přenosu hydridového iontu na uhlík C-5, který je díky přítomnosti dvojně vazby s dusíkem (imin) parciálně kladně nabitý a umožňuje tak tento nukleofilní atak (obr. 18). Připojením hydridového iontu na C-5 dojde k posunu dvojně vazby na atom dusíku, který tím získá záporný náboj a stává se silným nukleofilem (a bází), jež následně přijímá z bezprostředního okolí proton (druhý nukleofilní atak) a redukce dvojně vazby iminu je tímto dokončena. Podmínkou pro přenos je dostatečná blízkost kofaktoru a substrátu v aktivním místě enzymu (Grinter & Greening, 2021).



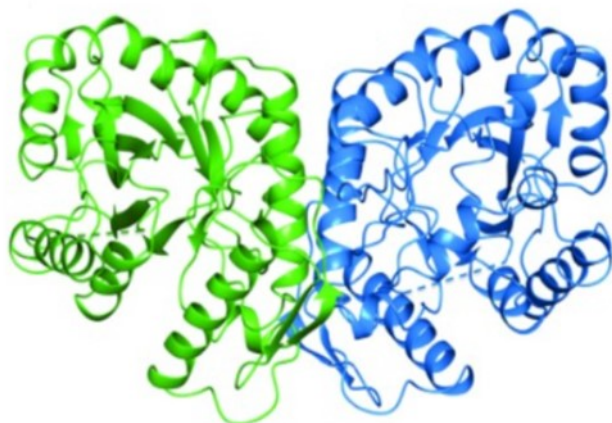
Obr. 18: Mechanismus hydridového přenosu u Apd6 redukujících jednu dvojnou vazbu (endocyklickou) substrátu - Por15, Lim12, SibT, HrmD, donorem dvou vodíků je kofaktor $F_{420}H_2$ a akceptorem je substrát Apd6, červenými čísly (1-3) je vyznačen směr jednotlivých kroků reakce, v červeném kruhu je molekula zprostředkovávající nukleofilní atak (nejprve H^- , v dalším kroku N^-), v červeném obdélníku je vyznačeno místo redukce, v šedém kruhu je detailně vyobrazena struktura kofaktoru v redukovaném ($F_{420}H_2$) a v oxidovaném stavu (F_{420}), v modrém obdélníku je vyznačeno umístění obou přenášených vodíků u $F_{420}H_2$ (převzato a upraveno z Steiningerová et al., 2020; Grinter & Greening, 2021).

4.2 $F_{420}H_2$ -závislé enzymy u bakterií

Enzymy používající neobvyklý F_{420} jako svůj kofaktor se původně dělily do čtyř základních skupin podle jejich 3D uspořádání - LLHT (luciferase-like hydride transferases), flavin-/deazaflavinové oxidoreduktasy (FDOR), pyridoxin-5'-fosfát oxidasy (PNPO) a deazaflavin-závislé nitroreduktasy (DDN). Vzhledem k přibývajícím, nově objeveným $F_{420}/F_{420}H_2$ -závislým enzymům byla ovšem tato původní klasifikace označena recentně za nedostatečnou. Mascotti et al. provedli rozsáhlou analýzu doposud objevených $F_{420}/F_{420}H_2$ -závislých enzymů a za pomoci dat ze strukturních databází a porovnáním jejich sekvencí je nově rozdělili do pěti tříd, kde každá třída je definována charakteristickým motivem vážící kofaktor F_{420} . Třída I. zahrnuje rodinu LLHT, kam se dle sekvenční podobnosti řadí i Apd6 proteiny (Mascotti et al., 2021).

4.2.1 LLHT rodina - se zaměřením na $F_{420}/F_{420}H_2$ -závislé enzymy

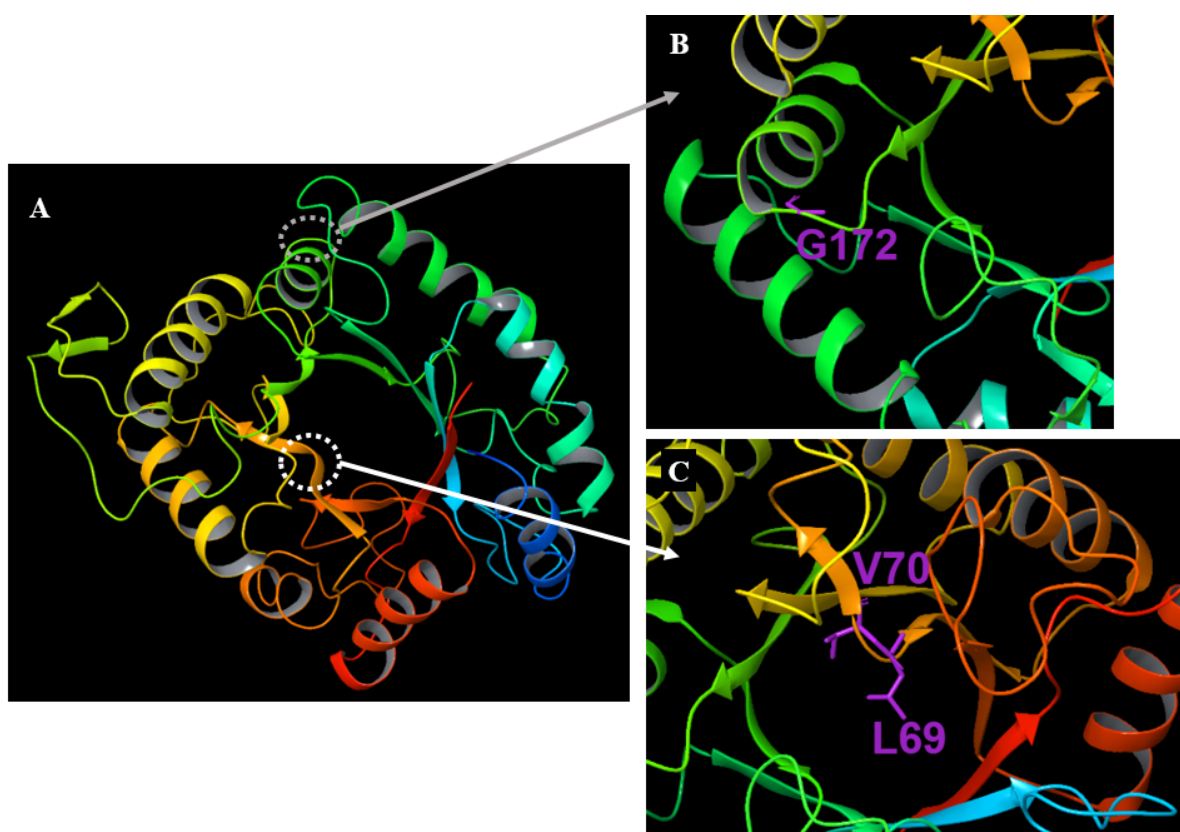
LLHT rodina zahrnuje mnoho různých enzymů - oxidasy, reduktasy, oxygenasy, které mohou používat různé kofaktory - F_{420} , FMN, FAD (Bashiri et al., 2008; Fisher et al., 1996). Jedná se tedy o velice diverzifikovanou skupinu enzymů, ovšem F_{420} -závislé enzymy z LLHT rodiny lze odlišit za pomoci stejných sdílených znaků, jimiž jsou konzervovaný glycin v aminokyselinové sekvenci (Aufhammer et al., 2005), dále sdílí podobný TIM-barel motiv - $(\alpha\beta)_8$ (obr. 19), který váže kofaktor F_{420} (Bashiri et al., 2008; Purwantini & Mukhopadhyay, 2013) a neobvyklou ne-prolyl *cis* peptidovou vazbu (Aufhammer et al., 2004; Aufhammer et al., 2005). Rodina LLHT se dělí na dvě podskupiny dle fylogenetické rekonstrukce - první podskupinou jsou F_{420} -závislé dehydrogenasy a druhou F_{420} -závislé reduktasy - tam se řadí Apd6 proteiny (Mascotti et al., 2018).



Obr. 19: 3D model dvou $(\alpha/\beta)_8$ TIM barelů (barevně odlišené) z homodimeru proteinu Rh-FGD1 z *Rhodococcus jostii*, patřícího do LLHT rodiny (převzato z Nguyen et al., 2017).

Mezi významné zástupce rodiny LLHT s anotovanou funkcí i strukturou patří například archeální enzymy: F_{420} -redukující sekundární alkoholdehydrogenasa (Adf), F_{420} -závislá methylenetetrahydromethanopterin reduktasa (Mer), F_{420} -redukující methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenasa (Mtd). Mtd vyizolovaná z *Methanopyrus kandleri* je vůbec první enzym z LLHT rodiny, u kterého byla determinována 3D struktura, enzym tvoří homoheksamer. Ve svém aktivním místě obsahuje Mtd-odvozený motiv, který je unikátní. Mtd se nachází u methanogenních *Archaea*, u kterých se účastní methanogeneze (Hagemeier et al., 2003). Druhým enzymem s determinovanou strukturou z LLHT rodiny byl Adf, který tvoří homodimer. Adf byl vyizolován z *Methanoculleus thermophilicus*. Funkce tohoto enzymu v methanogenních *Archaea* je získání energie redukcí sekundárních alkoholů. Při reakci dochází zároveň k redukci kofaktoru F_{420} na $F_{420}H_2$, redukovaná forma kofaktoru se dále účastní jiných metabolických procesů, jako například CO_2 -redukčních drah (Aufhammer et al., 2004). Posledním zmíněným, anotovaným archeálním enzymem patřícím do LLHT rodiny je Mer vyizolovaný z *Methanosarcina barkeri*. Tento enzym tvoří homodimer. Nachází se u methanogenních a sulfát-redukujících *Archaea* (Aufhammer et al., 2005). Přestože sekvence homologie Mer a Adf je pouze 21 %, aktivní místa obou enzymů jsou velice podobná, což souvisí s vazbou kofaktoru F_{420} (Aufhammer et al., 2004; Aufhammer et al., 2005).

Prvním bakteriálním, strukturně anotovaným enzymem z LLHT rodiny byla F_{420} -redukující glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (FGD) z *Mycobacterium tuberculosis*, označovaná jako Mtb-FGD1. Tento protein tvoří homodimer. Mtb-FGD1 zprostředkovává dehydrogenaci (oxidaci) glukosy-6-fosfátu na 6-fosfoglukonolakton a zároveň redukuje kofaktor F_{420} na $F_{420}H_2$, který dále slouží jako zdroj elektronů pro redoxní reakce v buňce (Bashiri et al., 2008). O 9 let později byla determinována struktura FGD z *Rhodococcus jostii*, označovaná jako Rh-FGD1, protein tvoří homodimer. Aminokyselinové zbytky v aktivním místě a v „kapse“ vážící kofaktor jsou u obou enzymů (Mtb-FGD1 a Rh-FGD1) konzervované, jediná odlišnost je přítomnost inzercí na C-konci TIM-barelu u Rh-FGD1, které jsou pro tento enzym unikátní a nenachází se u žádného doposud objeveného homologu Rh-FGD1 (Nguyen et al., 2017). Recentně byla vyřešena struktura apoenzymu LmbY, jako první $F_{420}H_2$ -závislé oxidoreduktasy ze specializovaného metabolismu aktinobakterií (Zdvořáková et al., v přípravě). LmbY je homodimer s aktivním místem v obou podjednotkách, který stejně jako ostatní strukturně popsání členové této rodiny, nese všechny charakteristické znaky LLHT rodiny - TIM-barel, ne-prolyl *cis* peptidovou vazbu i konzervovaný glycin účastnící se vazby kofaktoru F_{420} (obr. 20).

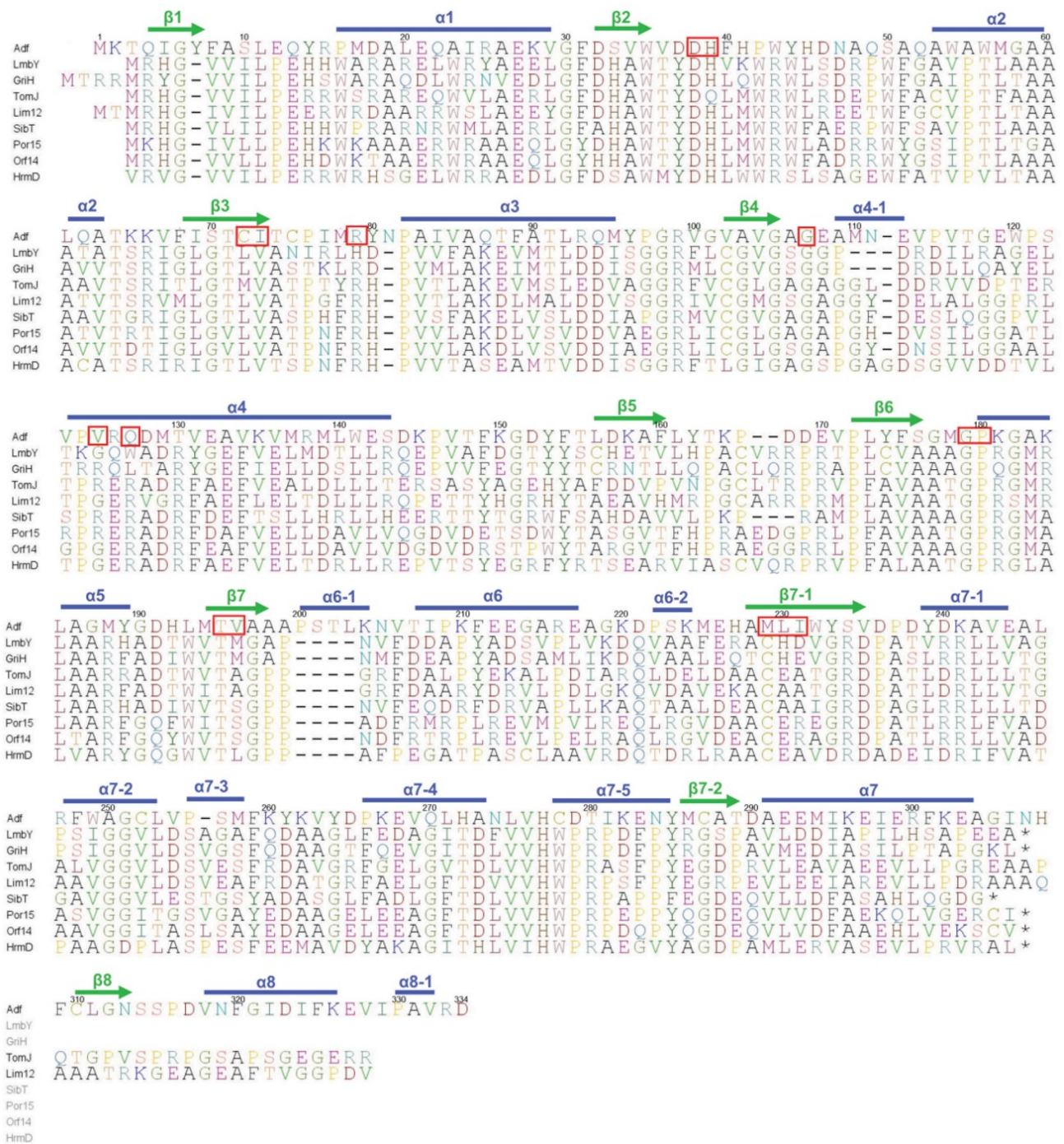


Obr. 20: A - krystalová struktura homodimeru LmbY, zobrazena je jedna podjednotka, která je tvořena TIM-barelem charakteristickým pro LLHT rodinu proteinů. Detaily dalších konzervovaných znaků LLHT rodiny: B - konzervovaný glycin - G172 (zvýrazněn fialově) interagující s kofaktorem F_{420} . C - ne-prolyl *cis* peptidová vazba mezi aminokyselinami L69-V70 (zvýrazněny fialově).

4.2.2 Hypotézy o rozdílné reakční specifitě Apd6 proteinů

4.2.2.1 Hypotézy formulované na základě sekvenčních dat a homologních modelů

Prvotní hypotéza vysvětlující rozdílnou reakční specifitu Apd6 proteinů byla založena na porovnání sekvencí Apd6 proteinů se sekvencí proteinu Adf (obr. 21) v kombinaci s vytvořením schémat domnělých aktivních míst Apd6 proteinů (Steiningerová, 2020a).



Obr. 21: Sekvenční srovnání Adf a Apd6 proteinů - Por15, SibT, Lim12, Orf14, TomJ (z biosyntézy PBD), GriH (z biosyntézy griselimycinu), HrmD (z biosyntézy hormaomycinu) a LmbY (z biosyntézy linkomycinu), motivy sekundární struktury jsou znázorněny nad sekvencí Adf (α - označeno modře, β - označeno zeleně), důležité aminokyselinové zbytky hrající roli při vazbě substrátu a kofaktoru F₄₂₀ u Adf jsou označeny červeným obdélníkem, číslování aminokyselin odpovídá sekvenci Adf (převzato a upraveno z Steiningerová, 2020a).

Byla determinována vysoce konzervovaná oblast (obr. 22; D38-W43; dále číslování aminokyselin dle sekvence Adf, není-li uvedeno jinak) a bylo hypotetizováno, že právě tato oblast je součástí vazebného místa, jsou zde přítomny katalyticky aktivní zbytky a je přímo zodpovědná za odlišné natočení substrátu vzhledem ke kofaktoru F₄₂₀, což by mělo být dle stanovené hypotézy podstatou rozdílné reakční specifity Apd6 proteinů. Jinými slovy, pokud je substrát ve vazebném místě orientován ke kofaktoru tak, že je přednostně umožněn hydridový atak uhlíku exocyklické dvojně vazby substrátu, dojde ke dvojnásobné redukci a výsledným produktem je plně nasycený APD prekursor (enzymová aktivita reprezentovaná enzymem LmbY). Naopak pokud je substrát vzhledem ke kofaktoru umístěn tak, že hydrid přednostně atakuje uhlík endocyklické dvojně vazby substrátu, dojde pouze k jednonásobné redukci, neboť exocyklická vazba, která již není v konjugaci, je nepřístupná jakékoli další redukci. Výsledným produktem je v tomto případě mono-nenasycený APD prekursor (enzymová aktivita reprezentovaná enzymem Por15). Mutacemi aminokyselinových zbytků v definované oblasti (D38-W43) a následným testováním mutantních variant proteinů *in vitro* se ovšem hypotézu nepodařilo prokázat a na otázku molekulární podstaty odlišné reakční specifity nebylo tímto odpovězeno (pro úplnost, studie navrhovala a následně testovala i některé další aminokyseliny, které se pro vazbu substrátu a kofaktoru zdály být esenciální, nicméně ani tyto mutanty nepřinesly odpověď).

					38					43		
Adf	V	W	V	D	D	H	F	H	P	W	Y	H
LmbY	A	W	T	Y	D	H	V	K	W	R	W	K
GriH	A	W	T	Y	D	H	L	Q	W	R	W	L
TomJ	A	W	T	Y	D	Q	L	M	W	R	W	L
Lim12	A	W	T	Y	D	H	L	M	W	R	W	L
SibT	A	W	T	Y	D	H	L	M	W	R	W	F
Por15	A	W	T	Y	D	H	L	M	W	R	W	L
Orf14	A	W	T	Y	D	H	L	M	W	R	W	F
HrmD	A	W	M	Y	D	H	L	W	W	R	W	L

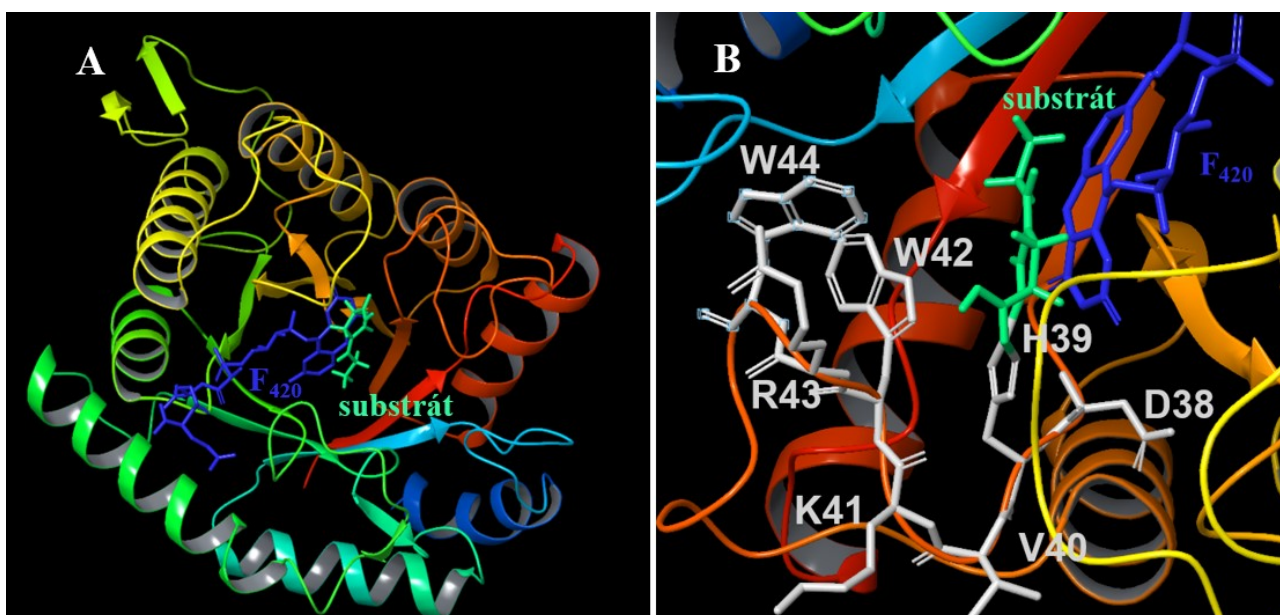

 Predikované substrát-vazebné místo

Obr. 22: Detail srovnání aminokyselinových sekvencí predikovaného substrát-vazebného místa - oblast D38 - W43 (číslování dle sekvence Adf), modře vyznačeny jsou lišící se aminokyseliny předpokládaného substrát-vazebného místa u Apd6 proteinů (převzato a upraveno z Steiningerová, 2020a).

4.2.2.2 Hypotézy formulované na základě struktury LmbY

Vyřešení struktury apoenzymu LmbY otevřelo dveře k formulacím nových hypotéz o esenciálních aminokyselinových zbytcích určujících reakční specifitu Apd6 proteinů (Zdvořáková et al., v přípravě).

Vzhledem k tomu, že se prozatím nepodařilo získat strukturu LmbY s navázaným substrátem a/nebo kofaktorem F_{420} , byl vytvořen model znázorňující jejich hypotetickou vazbu (obr. 23A). Z modelu je zjevné, že již dříve determinovaná konzervovaná oblast (D38-W43) z části skutečně s nejvyšší pravděpodobností utváří kapsu aktivního místa (obr. 23B).



Obr. 23: A - 3D model aktivního místa LmbY s navázaným kofaktorem F_{420} (znázorněno tmavě modře) a substrátem (vyznačen zeleně). B - konzervované aminokyseliny předpokládaného aktivního místa - D38, H39, V40, K41, W42, R43, navíc je ještě vyznačena následující konzervovaná aminokyselina - W44, všechny aminokyseliny vyobrazeny světle šedou, kofaktor F_{420} - tmavě modře a substrát zeleně.

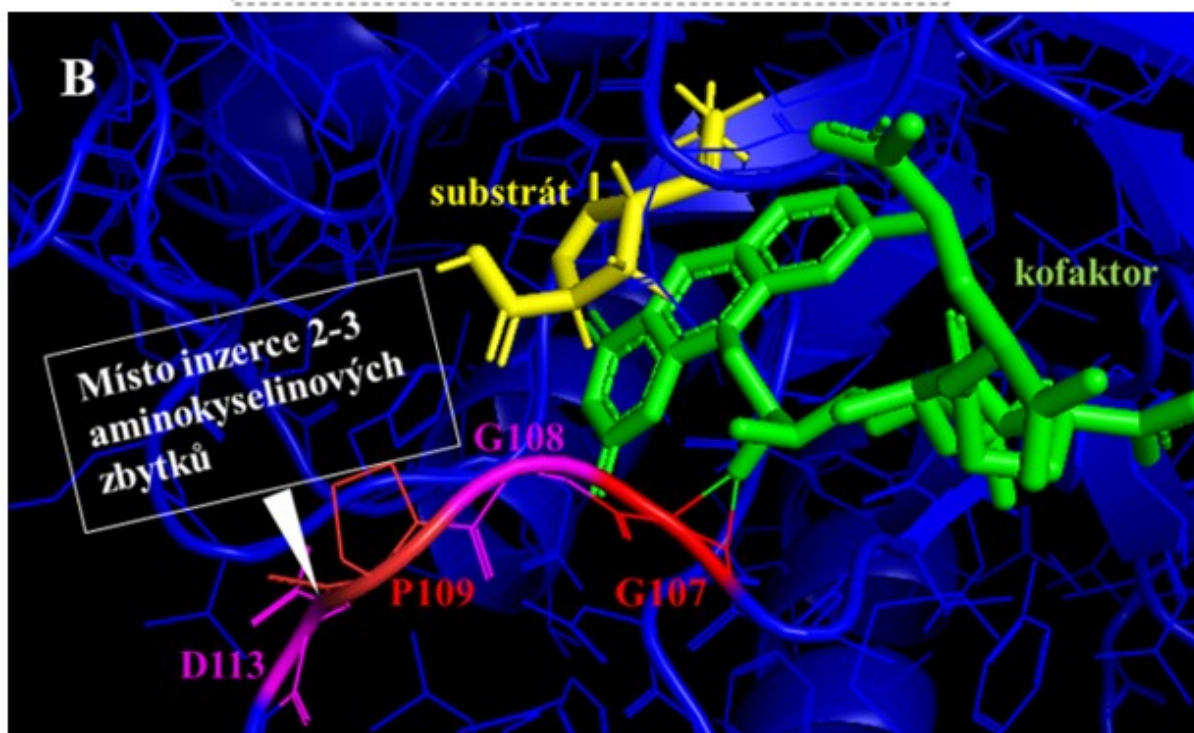
Hypotéza o podstatě rozdílné reakční specifity, tedy že rozdílnost je dána odlišným natočením substrátu vzhledem ke kofaktoru, zůstává stejná. Na základě zkonstruovaných modelů byli jako kandidáti odpovědní za rozdílné interakce (a tedy samotnou vzájemnou pozici substrátu a F_{420}) nově determinovány následující oblasti/aminokyseliny:

Oblast G107-D113

Hledáním výrazných sekvenčních odlišností v okolí predikovaného vazebného místa Apd6 proteinů (stanovené ze strukturního 3D modelu - obr. 22) byla nalezena oblast ohraničená konzervovanými G107 a D113 (obr. 24A). Co je zajímavé, u LmbY (dvojnásobná redukce) zbytky v pozicích 110 a 111 zcela chybí, naopak u jednonásobně redukujících proteinů (Apd6 z PBD: TomJ, Lim12, Por15, SibT a Apd6 z hormaomycinu: HrmD) je v pozici 110 konzervovaný G, který je následován variabilním zbytkem v pozici 111 (L, Y, F, H, A). U HrmD jako jediného Apd6 proteinu je ještě navíc přítomen jeden další aminokyselinový zbytek - G112. Ze srovnání sekvencí vyplývá, že i v případě GriH (katalyzuje jedno- i dvojnásobnou redukci), stejně jako u LmbY, aminokyseliny v pozici 110-112 chybí. Byla stanovena hypotéza, že vmezeření dvou/tří aminokyselin do proteinové sekvence způsobuje významný posun peptidového řetězce, který má vliv na interakce G107 s F_{420} (interakce s C-2 bočním řetězcem) a dále na interakci aminokyseliny 108 (u LmbY a GriH shodně G, zatímco u ostatních Apd6 proteinů A/S) s endocyklickým N-1 kofaktoru F_{420} . Konkrétně vmezeření způsobí to, že u LmbY bude C-5 isoalloxazinu F_{420} (redoxně aktivní místo) blíže k exocyklické dvojně vazbě substrátu, která tedy bude jako první redukována. Následovat by měla konformační změna jednonásobně redukovaného substrátu, výměna „vybitého“ F_{420} za $F_{420}H_2$ a redukce endocyklické dvojně vazby ve druhém kroku. U Apd6 z PBD se předpokládá opačný model, tedy že C-5 isoalloxazinu bude ve výhodnější pozici (blíže) pro redukci endocyklické dvojně vazby substrátu (a tedy exocyklická dvojná vazba zůstává ve finálním prekursoru zachována, neboť již není v konjugaci a je tedy netečná k redukci). Konaformační změna po první redukci uvolní mono-nasycený APD prekursor a F_{420} z vazebného místa proteinu.

A

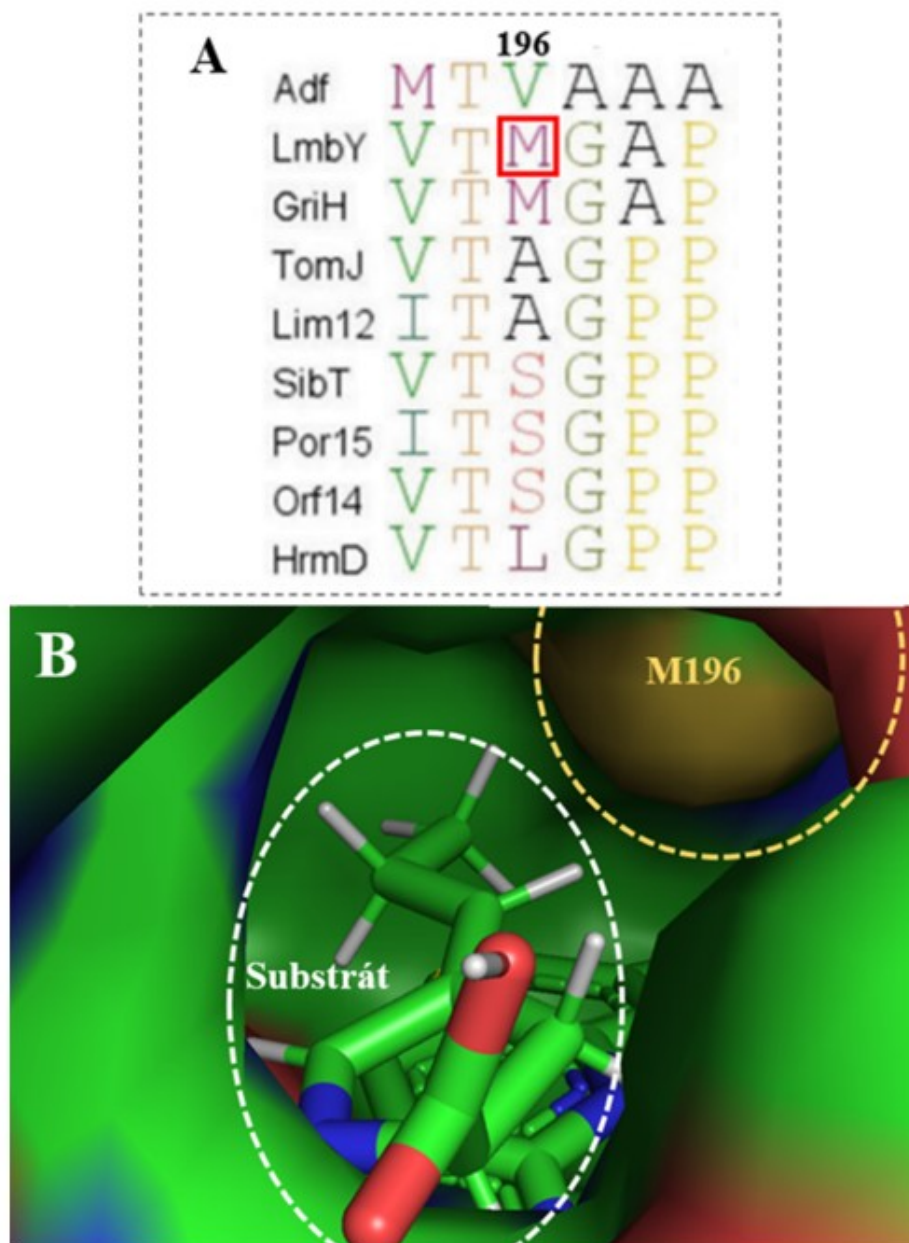
	107	110	113
Adf	A G E A M N - E		
LmbY	S G G P - - - D		
GriH	S G G P - - - D		
TomJ	A G A G G L - D		
Lim12	S G A G G Y - D		
SibT	A G A P G F - D		
Por15	A G A P G H - D		
Orf14	S G A P G Y - D		
HrmD	A G S P G A G D		



Obr. 24: A - Porovnání sekvencí Adf a Apd6 proteinů v oblasti G107-D113 (číslování dle sekvence Adf), v červeném obdélníku jsou vyznačeny chybějící aminokyseliny v pozicích 110-112 u LmbY a GriH, ve fialovém obdélníku je konzervovaný G v pozici 110 u TomJ, Lim12, SibT, Por15, Orf14 a HrmD, v modrém obdélníku je vyznačen G112, který se nachází pouze u HrmD (převzato a upraveno z Steiningarová, 2020a). B - Model předpokládaného aktivního místa LmbY s navázaným kofaktorem F₄₂₀ (vyznačen zeleně) a substrátem (vyznačen žlutě). Červeně a růžově jsou vyznačeny aminokyseliny G107, G108, P109, D113. Bílou šipkou je vyznačeno místo, kde jsou v peptidových řetězcích homologů Apd6 vmezeřeny dvě (PBD) či tři (hormaomycin) aminokyseliny.

Aminokyselina v pozici 196

Dalším kandidátním zbytkem formujícím vazebné místo, který by mohl vysvětlit podstatu rozdílné reakční specifity Apd6 proteinů, je zbytek v pozici 196 (obr. 25A). Zatímco u LmbY a GriH je v této pozici M, u jednonásobně redukujících Apd6 se nachází S (SibT, Por15, Orf14), A (TomJ, Lim12) či L (HrmD). Hypotéza v tomto případě předpokládá, že boční řetězec methioninu u LmbY a GriH tvoří v aktivním místě jakousi „výdut“ (obr. 25B), která stéricky brání úplnému zasunutí substrátu do vazebného místa. V důsledku je proto v případě LmbY nejprve redukována vazba na bočním řetězci substrátu (exocyklická), tím se stane boční řetězec substrátu flexibilnější a může být „zasunut“ dále do aktivního místa, bezprostředně tedy následuje druhá redukce, tentokrát již v kruhu (redukce endocyklické vazby). Tato hypotéza ovšem plně nevysvětluje reakční specifitu GriH, neboť produktem *in vitro* reakce tohoto enzymu je směs nasycených a mono-nenasycených produktů (Steiningerová et al., 2020). Předpokládá se, že v případě GriH bude hrát důležitou roli i další, dosud nestanovený zbytek.



Obr. 25: A - Porovnání sekvencí Adf a Apd6 proteinů, v červeném obdélníku vyznačen zbytek M196 u LmbY (převzato a upraveno z Steiningrová, 2020a). B - model LmbY - methionin stéricky brání substrátu v hlubším zasunutí do aktivního místa enzymu (výduť tvořená M196 vyznačená v žlutém kruhu).

4.3 F₄₂₀-závislé enzymy - využití v biotechnologiích

Vzhledem k účasti F₄₂₀-závislých enzymů na detoxifikačních procesech, mají tyto enzymy velký potenciál při bioremediacích (shrnuto v Taylor et al., 2013). Bylo prokázáno, že některé F₄₂₀-závislé reduktasy (např. u některých druhů *Rhodococcus* a *Nocardia*) mohou redukovat dusíkaté aromatické cykly například u kyseliny pikrové, u 2,4-dinitrofenolu (Ebert et al., 2001; Heiss et al., 2002), nebo u

2,4-dinitroanisolu (Fida et al., 2014), kdy všechny zmíněné látky slouží jako zdroj dusíku. Za pomoci $F_{420}H_2$ -závislých reductas umí některé mikroorganismy degradovat například i vysoce karcinogenní a hepatotoxické mykotoxiny - aflatoxiny (produkované *Aspergillus flavus* a *A. parasiticus* v tropických oblastech; Ciegler et al., 1966), nebo toxická, organická barviva jako malachitovou zeleň (Jones & Falkinham, 2003).

Důležitost těchto enzymů byla prokázána i v biokatalýze, kdy některé $F_{420}H_2$ -závislé enzymy z FDOR a LLHT rodin jsou schopné redukovat stereoselektivně enony a iminy v různých heterocyklech. Asymetrická redukce iminů enzymy a její další vývoj je důležitý, neboť přibližně 40 % veškerých farmaceuticky používaných a 20 % v zemědělství využívaných látek obsahuje alespoň jeden chirální amin (shrnutí v Greening et al., 2016).

Překážkou při možném využití $F_{420}/F_{420}H_2$ -závislých enzymů představuje fakt, že mnoho těchto enzymů, identifikovaných za pomoci bioinformatických metod, není doposud anotovaných (shrnutí v Greening et al., 2016). Dalším problémem představuje původ těchto enzymů, jsou většinou kódovány nekultivatelnými mikroorganismy, které navíc používají neobvyklé kodóny pro aminokyseliny (shrnutí v Taylor et al., 2013). Za zmínku také stojí fakt, že kofaktor F_{420} nelze komerčně zakoupit, a jeho chemická syntéza je vzhledem k jeho komplikované struktuře téměř nemožná, což představuje další překážku. Laboratoře se proto snažily F_{420} produkovat v organismech, u kterých se F_{420} přirozeně vyskytuje, ovšem kultivace některých druhů je časově i finančně náročná. Jako nejlepší kandidát pro produkci a purifikaci F_{420} se ukázal *Mycobacterium smegmatis* (Isabelle et al., 2002). Velký průlom nastal při úspěšné produkci F_{420} v *E. coli* (Bashiri et al., 2019). Výtěžky F_{420} u *E. coli* jsou srovnatelné s bakteriemi, které F_{420} přirozeně produkují, navíc kultivace *E. coli* je méně časově i finančně náročná.

LmbY (Apd6 z biosyntézy linkomycinu) přirozeně v biosyntéze zprostředkovává asymetrickou redukci cyklických prochirálních iminů, v biotechnologickém průmyslu by tak mohl najít uplatnění právě v tak žádané stereoselektivní redukci iminů. Objasnění molekulární podstaty reakční specifity Apd6 enzymů je ovšem esenciálním předpokladem pro jakékoliv další studie a konkrétní aplikace.

5. Cíle práce

Cílem této práce je položení základu strukturně-funkční studie vybraných enzymů z biosyntézy 4-alkyl-L-prolinových derivátů, prekursorů inkorporovaných do několika významných skupin aktinobakteriálních specializovaných metabolitů. Do studie byli vybráni zástupci dvou skupin enzymů se slibným biotechnologickým potenciálem - SAM-závislá methyltransferasa LmbW (Apd3 - linkomycin) a dvě $F_{420}H_2$ -závislé reduktasy LmbY a Por15 (Apd6 - linkomycin, resp. porothramycin). Cíle práce jsou definovány následovně:

1. Krystalizace proteinu LmbW pro rentgenovou difrakci za účelem stanovení přirozeného substrátu

- Heterologní produkce a purifikace proteinu LmbW v kvantitě a kvalitě vhodné pro krystalizaci
- Krystalizace LmbW- stanovení krystalizačních podmínek poskytujících růst krystalů
- Optimalizace krystalizace - nalezení podmínek, za kterých protein tvoří krystaly dostatečné velikosti a kvality vhodné pro rentgenovou difrakci

2. Objasnění molekulární podstaty rozdílné reakční specifity Apd6 homologů

A) Cílená mutagenese proteinů Por15 a LmbY - ověření hypotéz stanovených na základě modelu vazby substrátu a kofaktoru F_{420} u struktury LmbY

- Cílená mutagenese proteinů Por15 a LmbY
- Heterologní produkce a purifikace mutantních proteinů
- Testování aktivity mutantních proteinů *in vitro*

B) Příprava krystalů pro stanovení 3D struktury proteinu Por15 ve formě holoenzymu

- Optimalizace krystalizace Por15 - nalezení vhodných podmínek pro tvorbu krystalů dostatečné velikosti a kvality vhodné pro rentgenovou difrakci

6. Materiál a metody

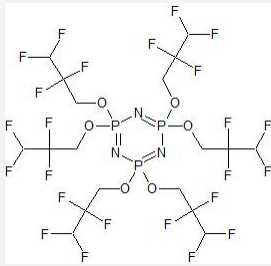
6.1 Materiál

6.1.1 Chemikálie

Chemikálie	Výrobce
1,3-bis(tris(hydroxymethyl)methylamino)propan (Bis-Tris-propan)	Sigma-Aldrich
1,4-dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
2-ethansulfonová kyselina (MES)	Sigma-Aldrich
3-(<i>N</i> -morfolino)propansulfonová kyselina (MOPS)	Sigma-Aldrich
3-(Tris(hydroxymethyl)methylamino)-1-propansulfonová kyselina (TAPS)	Sigma-Aldrich
3',5'-dimethoxyflavon (Tricin)	Sigma-Aldrich
50x TAE (Tris-acetát-EDTA pufr)	BioConcept
Acetonitril ($\geq 99,9\%$, CH_3CN)	Sigma-Aldrich
Agarosa SeaKem® LE pro gely na elektroforézu	Lonza Bioscience
Akryl/Bis 37.5:1 (30:0.8), 40% (w/v) roztok	VWR Life Science
Anderson-Evans polyoxotungstát (TEW, $[\text{TeW}_6\text{O}_{24}]^{6-}$)	Sigma-Aldrich
Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan (Bis-Tris)	Sigma-Aldrich
Citronan sodný dihydrát ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich
Comassie brilliant blue G-250	Serva
Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)	Lach-ner
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
DNA vzorkový pufr 6x (Gel Loading Dye Purple)	BioLabs
Dodecylsulfát sodný (SDS)	Sigma-Aldrich
ESI-L kalibrační směs o nízké koncentraci (ESI-L Low Concentration Tuning Mix)	Agilent Technologies
Ethanol (96%, $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$)	Lachema
Ethydium bromid	Sigma-Aldrich
Ethyldiaminotetraoctová kyselina disodná sůl dihydrát (EDTA)	PanReac AppliChem
Glycerol	Lachema
Glycin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)	PanReac AppliChem
Glycylglycin ($\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$)	Sigma-Aldrich
Hydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4)	Lach-ner
Hydroxid draselný (KOH)	Lach-ner
Hydroxid sodný (NaOH)	Lach-ner
Chlorid amonný (NH_4Cl)	Lach-ner
Chlorid hořečnatý hexahydrát ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Lach-ner
Chlorid manganatý tetrahydrát ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	Lach-ner
Chlorid sodný (NaCl)	Lach-ner
Chlorid vápenatý dihydrát ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Lach-ner
Imidazol, (99%, 1,3-diazacyklopenta-2,4-dien, $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$)	Alfa Aesar
Isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Serva
Kyselina citronová ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	Sigma-Aldrich
Kyselina chlorovodíková (HCl)	Lachema
Kyselina mravenčí (HCOOH)	VWR Life Science

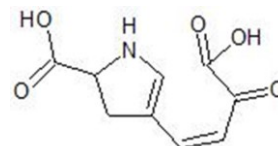
Kyselina <i>N'</i> -2-hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2 ethansulfonová (HEPES)	Sigma-Aldrich
L-prolin (C ₅ H ₉ NO ₂)	Sigma-Aldrich
LB-agar (Luria/Miller)	Carl Roth
LB-medium (Luria/Miller)	Carl Roth
Methanol (≥99,9%, CH ₃ OH)	Lachema
Midori Green Xtra	NIPPON Genetics EUROPE
<i>N, N, N', N'</i> -tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva
Peroxodisíran amonný (APS)	Sigma-Aldrich
Polyethylenglykol (PEG) 400	Sigma-Aldrich
Polyethylenglykol (PEG) 4000	Sigma-Aldrich
<i>S</i> -(5'-adenosyl)- <i>L</i> -methionin chlorid dihydrochlorid (SAM)	Sigma-Aldrich
Síran amonný ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich
Síran hořečnatý heptahydrát (Mg ₂ SO ₄ ·7H ₂ O)	Lach-ner
Síran nikelnatý (NiSO ₄)	Sigma-Aldrich
Síran sodný (Na ₂ SO ₄)	Lach-ner
Tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid (TCEP)	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Alfa Aesar

6.1.2 Standardy, referenční látky, látky připravené v laboratoři

Standard / referenční látka	Výrobce	Specifikace
1 kb DNA Plus Ladder	Invitrogen	Velikost fragmentů [bp]: 100, 200, 300, 400, 650, 850, 1000, 1650, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10 000, 11 000, 12 000
Hexakis(1 <i>H</i> ,1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -perfluoropropoxy)fosfazen	Agilent Technologies	
Kofaktor F ₄₂₀	Připraveno vědeckou skupinou Dr. Bashiri, PhD., School of Biological Sciences, University of Auckland	C ₂₉ H ₃₃ N ₅ O ₁₈ P
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific	Molekulární hmotnosti [kDa]: 250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10

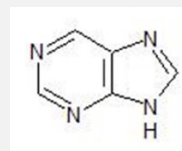
4-(3-karboxy-3-oxo-propenyl)-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol-2-karboxylová kyselina (látka 2)

Připraveno v laboratoři podle Novotná et al., 2004



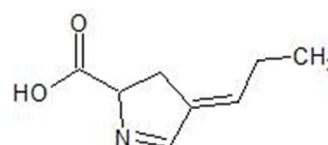
9*H*-purin

Agilent Technologies



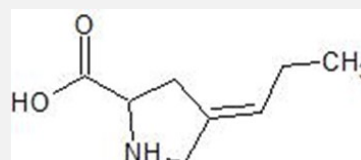
(2*S*,4*E*)-4-propyliden-3,4-dihydro-2*H*-pyrrol-2-karboxylová kyselina (látka 5a)

Připraveno Ing. Radkem Gažákem, Ph.D. (podle Zhong et al., 2017)



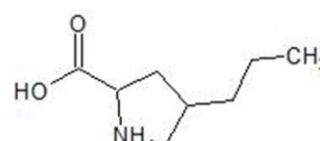
(2*S*,4*R*)-4-propylidenpyrrolidin-2-karboxylová kyselina (látka 7a)

Připraveno Ing. Radkem Gažákem, Ph.D.



(2*S*,4*R*)-4-propylpyrrolidin-2-karboxylová kyselina (látka 6a)

Připraveno Ing. Radkem Gažákem, Ph.D.



6.1.3 Antibiotika

Všechna níže uvedená antibiotika byla připravena jako 1000× koncentrovaný zásobní roztok.

Antibiotikum	Výrobce	Zásobní koncentrace	Rozpuštěno v	Selekce
Chloramfenikol	Serva	34 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	Ethanol	<i>pGroESL</i>
Kanamycin	PanReac AppliChem	30 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	Destilovaná voda	pET-42b(+)
Tetracyklin	Amresco	10 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	Ethanol	příprava kmene <i>E. coli</i> XL1-Blue (nese rezistenci na tetracyklin)

6.1.4 Použité bakteriální kmeny

Bakteriální kmen	Firma	Genetické pozadí kmene
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Stratagene	<i>F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-)</i> <i>λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7</i> <i>nin5])[malB+]_{K-12}(λS)</i>
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)/ <i>pGroESL</i>	Novagen	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) s vloženým plazmidem <i>pGroESL</i>
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	Stratagene	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> <i>supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq</i> <i>ZΔM15 Tn10 (Tetr)]</i>

6.1.5 Vektory pro heterologní nadprodukcí proteinů

Použité vektory

pET42b(+)_*lmbW*

pET42b(+)_*lmbY*

pET42b(+)_*por15*

Všechny výše uvedené konstrukty byly připraveny v rámci předchozích studií (Jirásková et al., 2016; Steiningerová, 2020a).

6.1.6 Kity

Název kitu	Výrobce
BCS Screen	Molecular Dimensions
JCSG+ Suite	Qiagen
Morpheus® screen	Molecular Dimensions
Morpheus® II screen	Molecular Dimensions
PACT premier™HT-96/FX-96	Molecular Dimensions
Plasmid DNA Purification NucleoBond® Xtra Midi/Maxi	Macharey-Nagel
Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (E0554)	New England BioLabs
SG1™ Screen	Molecular Dimensions
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systém	Promega
XP Screen	Jena Bioscience

6.1.7 Syntetické oligonukleotidy (primery)

Syntetické primery byly připraveny firmou Sigma-Aldrich a Eurofins Genomics, v obou případech šlo o lyofilizované primery, které byly rozpuštěny v TE⁻¹ pufru na koncentraci 100 μM. Na samotnou PCR byly použity primery naředěny 10× ze zásobní 100μM koncentrace. V tab. 2 níže jsou uvedeny sekvence primerů použitých pro PCR zprostředkovanou místně-specifickou mutagenézou. Tab. 3 uvádí sekvence primerů použitých pro sekvenční reakce.

Tab. 2: Syntetické oligonukleotidy pro PCR zprostředkovanou mutagenézou

Mutovaná aminokyselina/oblast	Přímý primer (od 5' konce)	Zpětný primer (od 5' konce)
<i>lmbY_inz_G110_H111</i>	GGGCACGACCGCGACAT ACTCCGCGCCGGC	GGGTCCGCCGGAGCCGACG CCGCACAGGAA
<i>por15_del_G110_H111</i>	GACGTGAGCATCCTCGGC GGCGCGACGCTC	GGGAGCGCCGGCGCCCAGC CCGCAGATCAG
<i>lmbY_G108A</i>	GGCTCCGGCGCACCCGAC CGCGA	GACGCCGCACAGGAAGCGG CCGC
<i>lmbY_M196A</i>	TGGGTCACGGCGGGCGCG CCGAA	GGTGTCCGCGTGGCGGGCG GCCA

Tab. 3: Syntetické oligonukleotidy použité pro sekvenční reakce

Název primeru	Sekvence primeru (od 5' konce)
pET univerzální primer 2 (UP2)	GATGCGTCCGGCGTAGAGG
T7 terminální primer	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG

6.1.8 Použité aparatury, přístroje a chromatografické kolony

Aparatura/ přístroj/ kolona	Výrobce
Acquity UPLC CSH C18, 1,7 μm, 2,1 mm × 50 mm (chromatografická kolona)	Waters
BioFrac Fraction Collector (automatický sběrač frakcí)	Bio-Rad
Biofuge pico (centrifuga)	Heraeus
Biometra Tone (PCR cykler)	Biometra
Difraktometr D8 Venture	Bruker
Dropsetter NT8 (krystalizační robot)	Formulatrix
Elmasonic S (ultrazvuková lázeň)	Elma
ENrich™ SEC 650 10 × 300 mm (chromatografická kolona)	Bio-Rad
Flowbox SafeFAST Classic	Schoeller Instruments
Helios γ (spektrofotometr)	Unicam
HiTrap™ HP 1ml / 5ml (chromatografické kolony)	Cytiva

Kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem 6546 LC/Q-TOF system	Agilent Technologies
Krystalizační hotel RI1000	Formulatrix
Kývačka pro barvení a promývání SDS-PAGE gelů Multi Bio 3D	BioSan
Minipuls 3 (pumpa na afinitní chromatografii)	Gilson
Mini PROTEAN® Tetra Cell (aparatura pro SDS-PAGE elektroforézu)	Bio-Rad
Multifuge X1R (centrifuga)	Thermo Scientific
NanoDrop 2000c (spektrofotometr na měření konc. DNA a proteinů)	Thermo Fisher Scientific
pH metr	Hanna Instruments
Prometheus (přístroj pro nanoDSF)	NanoTemper
SpectroLight 600/610 (přístroj pro DLS)	Xtal Concepts
Skříňový termostat (na statické kultivace na agarových plotnách)	Schoeller
Stereomikroskop SZX16	Olympus
Termoblok TDB-120	BioSan
Ultrasonic Homogenizer 4710	Cole-Parmer
Unitron rotační třepačka	Infors
Vakuová odparka Concentrator plus	Eppendorf
Zdroj napětí pro agarózové DNA gely EC-103	E-C Apparatus Corporation
Zdroj napětí pro SDS-PAGE (Electrophoresis power supply EPS 500/400)	Pharmacia

6.1.9 Použité softwarové programy, on-line databáze

Program	On-line přístup/poskytovatel	Funkce programu
Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0	Agilent Technologies	Program pro zpracování dat z MS
BLASTP (Basic Local Alignment Search Tool)	NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)	Program pro srovnání primárních sekvencí proteinů
Geneious 5.5.9	Geneious Biologics	Bioinformatický software pro analýzu sekvenčních dat
GenBank	NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)	Databáze sekvencí genů
ChemSketch 14.0	ACDLabs	Program pro vytváření chemických struktur
PyMol 2.5	Schrödinger, Inc (https://pymol.org/2/)	Program na vizualizaci molekul
RockMaker® Web (verze 3.17.9.1)	RockMaker® Crystallization Software (https://cms.ibt.biocev.org/RockMakerWeb/Login#!)	Software umožňující vzdálený přístup pro sledování destiček v krystalizačním hotelu

6.1.10 Média a půdy pro kultivaci bakterií a nadprodukcii heterologních proteinů

Název média	Složení média
50× M	3,6 g Na ₂ HPO ₄ , 3,4 g KH ₂ PO ₄ , 2,7 g NH ₄ Cl, 0,7 g Na ₂ SO ₄
LB tekuté médium	1000 ml destilované vody, 25 g LB média (Luria/Miller), pH neupravováno
LB agar	1000 ml tekutého LB média, 15g LB agaru (Luria/Miller), pH neupravováno
Obohacené LB médium	975 ml tekutého LB média, 20 ml 50× M, 0,5 g MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0,5% glycerol

6.1.11 Pufry a roztoky

Příprava buněk XL1-Blue

Pufr	Složení
Transformační pufr bez DMSO	25mM CaCl ₂ , 50mM MgCl ₂ ·6H ₂ O, 10mM MOPS, 25mM MnCl ₂ ·4H ₂ O, 200 ml destilované vody
Transformační pufr s DMSO	7,44 ml transformačního pufru bez DMSO a 0,56 ml 100% DMSO, finální konc. DMSO je 7%

Práce s DNA

Pufr/roztok	Složení
TE ⁻¹ pufr	0,1mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH 8,0

Purifikace a charakterizace proteinů

Pufr/roztok	Složení
Reakční pufr pro <i>in vitro</i> testování enzymatické aktivity mutant LmbY a Por15	500mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0
SDS-PAGE barvicí roztok	60-80 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 3 ml koncentrované HCl
SDS-PAGE elektrodový pufr (10× koncentrovaný)	30g Tris, 10g SDS, 144g glycinu, 1000 ml destilované vody
SDS-PAGE Tris-HCl pufr (pH 6,9)	1M Tris-HCl, pH 6,9
SDS-PAGE Tris-HCl pufr (pH 8,9)	1,875M Tris-HCl, pH 8,9
SDS-PAGE vzorkový pufr (2× koncentrovaný)	125mM Tris-HCl, 20% glycerol, 5% merkaptoethanol, 2% SDS, 0,002% bromfenolová modř, pH 6,8

Tris-HCl eluční pufr	20mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 250-300 mM imidazol, pH 8,0
Tris-HCl promývací pufr	20mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 75/100mM imidazol, pH 8,0
Tris-HCl pufr pro gelovou filtraci	20mM Tris-HCl, 100mM NaCl, pH 8,0
Tris-HCl sonikační pufr	20mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 5mM imidazol, pH 8,0

Pufry testované

na nanoDSF	Složení
Pufr 1	100mM glycin, pH 2,0
Pufr 2	100mM glycin, pH 3,0
Pufr 3	100mM glycin, 100mM NaCl, pH 2,0
Pufr 4	100mM glycin, 100mM NaCl, pH 3,0
Pufr 5	100mM glycin, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 2,0
Pufr 6	100mM glycin, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 3,0
Pufr 9	9,4mM Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O, 90,6mM C ₆ H ₈ O ₇ , pH 3,0
Pufr 10	33,8mM Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O, 66,2mM C ₆ H ₈ O ₇ , pH 4,0
Pufr 11	58,1mM Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O, 41,9mM C ₆ H ₈ O ₇ , pH 5,0
Pufr 12	82,5mM Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O, 17,5mM C ₆ H ₈ O ₇ , pH 6,0
Pufr 13	9,4mM Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O, 90,6mM C ₆ H ₈ O ₇ , 100mM NaCl, pH 3,0
Pufr 14	33,8mM Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O, 66,2mM C ₆ H ₈ O ₇ , 100mM NaCl, pH 4,0
Pufr 15	58,1mM Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O, 41,9mM C ₆ H ₈ O ₇ , 100mM NaCl, pH 5,0
Pufr 16	82,5mM Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O, 17,5mM C ₆ H ₈ O ₇ , 100mM NaCl, pH 6,0
Pufr 17	9,4mM Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O, 90,6mM C ₆ H ₈ O ₇ , 100mM NaCl, 2 mM TCEP, pH 3,0
Pufr 18	33,8mM Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O, 66,2mM C ₆ H ₈ O ₇ , 100mM NaCl, 2 mM TCEP, pH 4,0
Pufr 19	58,1mM Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O, 41,9mM C ₆ H ₈ O ₇ , 100mM NaCl, 2 mM TCEP, pH 5,0
Pufr 20	82,5mM Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O, 17,5mM C ₆ H ₈ O ₇ , 100mM NaCl, 2 mM TCEP, pH 6,0
Pufr 21	100mM MES, pH 5,0
Pufr 22	100mM MES, pH 5,5
Pufr 23	100mM MES, pH 6,0
Pufr 24	100mM MES, pH 6,5
Pufr 25	100mM MES, 100mM NaCl, pH 5,0
Pufr 26	100mM MES, 100mM NaCl, pH 5,5
Pufr 27	100mM MES, 100mM NaCl, pH 6,0
Pufr 28	100mM MES, 100mM NaCl, pH 6,5
Pufr 29	100mM MES, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 5,0
Pufr 30	100mM MES, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 5,5
Pufr 31	100mM MES, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 6,0
Pufr 32	100mM MES, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 6,5
Pufr 33	100mM Bis-Tris, pH 6,0
Pufr 34	100mM Bis-Tris, pH 6,5

Pufr 35	100mM Bis-Tris, pH 7,0
Pufr 36	100mM Bis-Tris, 100mM NaCl, pH 6,0
Pufr 37	100mM Bis-Tris, 100mM NaCl, pH 6,5
Pufr 38	100mM Bis-Tris, 100mM NaCl, pH 7,0
Pufr 39	100mM Bis-Tris, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 6,0
Pufr 40	100mM Bis-Tris, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 6,5
Pufr 41	100mM Bis-Tris, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 7,0
Pufr 42	100mM MOPS, pH 6,5
Pufr 43	100mM MOPS, pH 7,0
Pufr 44	100mM MOPS, pH 7,5
Pufr 45	100mM MOPS, 100mM NaCl, pH 6,5
Pufr 46	100mM MOPS, 100mM NaCl, pH 7,0
Pufr 47	100mM MOPS, 100mM NaCl, pH 7,5
Pufr 48	100mM MOPS, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 6,5
Pufr 49	100mM MOPS, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 7,0
Pufr 50	100mM MOPS, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 7,5
Pufr 51	100mM HEPES, pH 7,0
Pufr 52	100mM HEPES, pH 7,5
Pufr 53	100mM HEPES, pH 8,0
Pufr 54	100mM HEPES, 100mM NaCl, pH 7,0
Pufr 55	100mM HEPES, 100mM NaCl, pH 7,5
Pufr 56	100mM HEPES, 100mM NaCl, pH 8,0
Pufr 57	100mM HEPES, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 7,0
Pufr 58	100mM HEPES, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 7,5
Pufr 59	100mM HEPES, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 8,0
Pufr 60	100mM Tricin, pH 7,5
Pufr 61	100mM Tricin, pH 8,0
Pufr 62	100mM Tricin, pH 8,5
Pufr 63	100mM Tricin, 100mM NaCl, pH 7,5
Pufr 64	100mM Tricin, 100mM NaCl, pH 8,0
Pufr 65	100mM Tricin, 100mM NaCl, pH 8,5
Pufr 66	100mM Tricin, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 7,5
Pufr 67	100mM Tricin, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 8,0
Pufr 68	100mM Tricin, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 8,5
Pufr 69	100mM glycylglycin, pH 7,5
Pufr 70	100mM glycylglycin, pH 8,0
Pufr 71	100mM glycylglycin, pH 8,5
Pufr 72	100mM glycylglycin, 100mM NaCl, pH 7,5
Pufr 73	100mM glycylglycin, 100mM NaCl, pH 8,0
Pufr 74	100mM glycylglycin, 100mM NaCl, pH 8,5
Pufr 75	100mM glycylglycin, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 7,5
Pufr 76	100mM glycylglycin, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 8,0
Pufr 77	100mM glycylglycin, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 8,5
Pufr 78	100mM Bis-Tris-propan, pH 7,0
Pufr 79	100mM Bis-Tris-propan, pH 8,0
Pufr 80	100mM Bis-Tris-propan, pH 9,0
Pufr 81	100mM Bis-Tris-propan, pH 9,5
Pufr 82	100mM Bis-Tris-propan, 100mM NaCl, pH 7,0
Pufr 83	100mM Bis-Tris-propan, 100mM NaCl, pH 8,0
Pufr 84	100mM Bis-Tris-propan, 100mM NaCl, pH 9,0

Pufr 85	100mM Bis-Tris-propan, 100mM NaCl, pH 9,5
Pufr 86	100mM Bis-Tris-propan, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 7,0
Pufr 87	100mM Bis-Tris-propan, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 8,0
Pufr 88	100mM Bis-Tris-propan, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 9,0
Pufr 89	100mM Bis-Tris-propan, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 9,5
Pufr 90	100mM TAPS, pH 8,0
Pufr 91	100mM TAPS, pH 8,5
Pufr 92	100mM TAPS, pH 9,0
Pufr 93	100mM TAPS, 100mM NaCl, pH 8,0
Pufr 94	100mM TAPS, 100mM NaCl, pH 8,5
Pufr 95	100mM TAPS, 100mM NaCl, pH 9,0
Pufr 96	100mM TAPS, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 8,0
Pufr 97	100mM TAPS, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 8,5
Pufr 98	100mM TAPS, 100mM NaCl, 2mM TCEP, pH 9,0
Pufr 99	100mM Tris, pH 7,0
Pufr 100	100mM Tris, pH 7,5
Pufr 101	100mM Tris, pH 8,0
Pufr 102	100mM Tris, pH 8,5
Pufr 103	100mM Tris, pH 9,0
Pufr 104	100mM Tris, 100mM NaCl, pH 7,0
Pufr 105	100mM Tris, 100mM NaCl, pH 7,5
Pufr 106	100mM Tris, 100mM NaCl, pH 8,0
Pufr 107	100mM Tris, 100mM NaCl, pH 8,5
Pufr 108	100mM Tris, 100mM NaCl, pH 9,0
Pufr 109	100mM Tris, 100mM NaCl, 15% glycerol, pH 7,0
Pufr 110	100mM Tris, 100mM NaCl, 15% glycerol, pH 7,5
Pufr 111	100mM Tris, 100mM NaCl, 15% glycerol, pH 8,0
Pufr 112	100mM Tris, 100mM NaCl, 15% glycerol, pH 8,5
Pufr 113	100mM Tris, 100mM NaCl, 15% glycerol, pH 9,0
Pufr 114	50mM HEPES, 100mM CaCl ₂ , pH 7,5

6.2. Metody

6.2.1 Kultivace bakterií

6.2.1.1 Stanovení bakteriálního růstu za pomoci optické density

K určení růstu bakterií se nejčastěji používá spektrofotometrické měření optické density (OD). Standardně se používá vlnová délka 600 nm, a to z toho důvodu, že 600 nm odpovídá ve spektru viditelného světla oranžové barvě a dochází k nejmenší interferenci s LB médiem. Viditelné světlo také na rozdíl od UV světla nemá vliv na životaschopnost buněk. Jako pozadí měření se používá kulturační médium (s příslušnými antibiotiky) bez buněk. OD kultur bylo měřeno při přípravě kompetentních buněk XL1-Blue a dále při produkci proteinů. Pro určení OD byl použit spektrofotometr Helios γ (Unicam).

6.2.1.2 Kultivace kmenů *E. coli* - BL21 (DE3), BL21 (DE3)/pGroESL, XL1-Blue, NEB 5-alpha

Všechny kmeny *E. coli* byly kultivovány v tekutém LB médiu nebo na LB agarových plotnách. Na selekci transformantů byla do LB agaru/tekutého LB média přidána selekční antibiotika (chloramfenikol, kanamycin, tetracyklin; kap. 6.1.3) v odpovídající koncentraci. Standardní růstová teplota byla 37 °C, proteiny byly nadprodukovány po indukci při teplotě 17 °C. Tekuté kultury byly kultivovány v rotační třepačce Unitron (Infors) při rychlosti 180 RPM (rotation per minute), plotny byly kultivovány staticky v termoskříni nebo temperované místnosti. Konkrétní délky kultivací jsou uvedeny v příslušných kapitolách.

6.2.1.3 Příprava kompetentních buněk *E. coli* XL1-Blue

Bylo zaočkováno 10 µl kompetentních buněk ze zásobní konzervy *E. coli* XL1-Blue do 20 ml tekutého LB média s tetracyklinem (konc. 10 µg · ml⁻¹), buňky byly kultivovány po 10 ml v 50-ml centrifugačních zkumavkách se šroubovacím víčkem (Falcon) při 37 °C a 180 RPM po dobu 18 hodin. Další den ráno bylo inokulum zaočkováno do Erlenmeyerovy baňky se 100 ml tekutého LB média s tetracyklinem (10 µg · ml⁻¹), na OD₆₀₀ = 0,1. Poté se buňky kultivovaly v rotační třepačce při 18 °C a 180 RPM do OD₆₀₀ = 0,35-0,4 (24 - 26 hodin), následovala centrifugace (15 minut, 4000 × g, 4 °C). Po odstranění supernatantu, byly buňky resuspendovány v transformačním pufru bez dimethylsulfoxidu (DMSO; 50 ml kultivace - 5 ml pufru). Poté bylo do důkladně resuspendovaných buněk přidáno dalších 20 ml transformačního pufru bez DMSO. Následovala inkubace na ledu po dobu 1 hodiny a centrifugace (15 minut, 4000 × g, 4 °C). Supernatant byl odstraněn a buňky byly resuspendovány ve 2 ml transformačního pufru s DMSO, a dále byly rozděleny do 1,5 ml zkumavek (Eppendorf) po 100 µl alikvotech a uskladněny v -80 °C. DMSO se přidává k buňkám před zamrazením, protože se jedná o kryoprotektant, který brání tvorbě krystalků ledu, které by mohly buňky poškodit či usmrtit.

6.2.2 Metody práce s DNA

6.2.2.1 Stanovení koncentrace DNA spektrofotometricky

Na určení koncentrace DNA byl použit přístroj NanoDrop ND-800 (Thermo Fisher Scientific), jedná se o stanovení koncentrace v kapce (1 - 2 µl) vzorku obsahující DNA. Kapka vzorku je nanášena přímo na detekční povrch, vytvoří se sloupec mezi konci optických vláken za pomoci povrchového napětí kapky. Koncentrace DNA se měří při vlnové délce 260 nm, v této vlnové délce totiž nejvíce

absorbuje elektromagnetické záření. Jako pozadí pro měření byly použity roztoky, ve kterých se DNA nenachází.

6.2.2.2 Elektroforéza DNA v agarózovém gelu

Elektroforéza DNA v agarózovém gelu se používá k separaci molekul DNA. Principem metody je putování záporně nabitě DNA při průchodu elektrického proudu směrem ke kladně nabitě elektrodě. Rychlost posouvání DNA fragmentů a plasmidů v gelu je dána jejich velikostí a také formou. Kromě agarózy se do gelu ještě přidávají interkalační činidla (ethidium bromid - EtBr či Midori Green Xtra), která se váží na DNA a zviditelní ji pod UV světlem (EtBr) či pod zeleným/modrým LED světlem (Midori Green Xtra).

Postup přípravy gelu byl následovný: 0,5 g agarózy bylo rozpuštěno v 50 ml 1× koncentrovaného Tris-acetát-EDTA pufru (TAE), jednalo se tedy o 1% agarózový gel, po částečném schladnutí bylo přidáno 2,5 μ l EtBr nebo 4 μ l Midora Green Xtra. Procházející napětí při separaci bylo 3 - 5 V \cdot cm⁻¹. Jako standard molekulových velikostí DNA byl použit 1 kb Plus DNA Ladder.

6.2.2.3 Transformace cizorodé DNA do buněk *E. coli* za použití metody teplotního šoku

Na transformaci byly použity chemicky kompetentní buňky, tedy buňky schopné přijmout cizorodou DNA z okolí. Kompetence buněk byla navozena uměle v laboratoři, ovšem jedná se i o přirozeně se vyskytující vlastnost některých buněk.

Metoda teplotního šoku začala přidáním 5 - 10 ng plasmidové DNA k alikvotu kompetentních buněk (100 μ l), následná inkubace na ledu (20 - 30 minut) způsobila to, že se hydrofilní DNA navázala na povrch buněk, konkrétně na lipopolysacharidový receptor. Následovala inkubace 1 minutu ve 42 °C (termoblok), tento teplotní šok způsobil depolarizaci membrány, rozdíl nábojů vně buňky (kladný) a uvnitř (záporný) se zmenšil a tak byla záporně nabitá DNA schopna se dostat dovnitř buňky. Následná inkubace na ledu (1 - 2 minuty) obnovila původní membránový potenciál. Dále proběhla inkubace buněk v termobloku při 37 °C po dobu 1 hodiny s přidavkem 1 ml LB média. Po 1 hodině byly transformované buňky vysety buď na selekční LB agarovou plotnu s kanamycinem (30 μ g \cdot ml⁻¹, *E. coli* XL1-Blue a NEB 5-alpha - namnožení plasmidů pro následnou izolaci), nebo byly přeneseny do 20 ml LB média s přidavky příslušných selekčních antibiotik (30 μ g \cdot ml⁻¹ kanamycin, *E. coli* BL21(DE3) - produkce proteinu LmbW; 30 μ g \cdot ml⁻¹ kanamycin a 34 μ g \cdot ml⁻¹ chloramfenikol, *E. coli* BL21(DE3)/pGroESL -

produkce proteinů LmbY, Por15 - včetně mutant). Dále kultivace probíhala přes noc při 37 °C staticky (LB plotny), či v třepačce při 180 RPM (LB tekutá kultura).

Transformace kompetentních buněk *E.coli* kmene NEB 5- α z kitu E0554S měla obdobný postup transformace, ale s jinými časovými intervaly doporučenými výrobcem, postup byl následovný: inkubace na ledu byla 30 minut, teplotní šok - 30 sekund v 42 °C, inkubace na ledu 5 minut. Po inkubaci se přidalo 950 μ l SOC média pokojové teploty a následovala inkubace při 37 °C po dobu 1 hodiny v třepačce (60 RPM). Po 1 hodině inkubace se směs buněk a média naředila sterilní destilovanou vodou 10 \times a 100 μ l bylo vyseto na plotny LB agaru s kanamycinem (30 μ g \cdot ml⁻¹), následovala statická kultivace přes noc ve skříňovém termostatu při 37 °C.

6.2.2.4 Izolace plasmidové DNA

Izolace plasmidové DNA zahrnovala celkem tři kroky: (A) růst bakterií, (B) separaci bakterií a jejich lyzi a (C) samotnou izolaci plasmidové DNA. Plasmidová DNA byla purifikována z transformovaných *E. coli* XL1-Blue (Midiprep), nebo NEB 5- α (Miniprep), které nejprve přes noc rostly při 37 °C ve skříňovém termostatu na misce s LB agarem a kanamycinem (30 μ g \cdot ml⁻¹), další den bylo vybráno několik kolonií, které byly separátně zaočkovány do tekutého LB média s přídavkem kanamycinu (30 μ g \cdot ml⁻¹). Bakterie se nechaly růst přes noc při 37 °C v třepačce (180 RPM). Následující den se oddělilo médium od buněk za pomoci centrifugace (15 minut, 4000 \times g, 4 °C). Biomasa byla zpracována dle protokolu výrobce:

DNA Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega):

Principem izolace plasmidové DNA z malého objemu (10 ml původního kultivačního objemu, miniprep) je založen na odlišných chemických vlastnostech chromozomální a plasmidové DNA, kdy při alkalycké lyzi a následné rychlé neutralizaci se plasmidová DNA denaturuje a poté renaturuje, kdežto chromozomální nikoli. Celý postup začíná resuspendováním a poté lyzí buněk. Dále se v protokolu používá alkalická proteasa, která štěpí endonukleasy a další proteiny, neutralizačním pufrem je inaktivována. Po izolaci jsou dále používány speciální kolonky s aktivovaným sklem, které v přítomnosti chaotropní soli váží DNA. Následují promývací kroky, kdy se odmyjí veškeré nenavázané složky směsi a nakonec je DNA z kolonky vyvázána za pomoci ultračisté vody (roztok o nízké iontové síle).

Postup izolace plasmidové DNA začínal resuspendací buněk v 250 μ l resuspendačního roztoku, následovala lyze buněk přidáním 250 μ l lyzačního roztoku, který obsahuje dodecylsírán sodný (SDS) a NaOH. Zkumavky byly promíchány lehkým převrácením. Dále se přidalo 10 μ l alkalické proteasy, směs se opět promíchala převrácením zkumavek a nechala se inkubovat při pokojové teplotě 5 minut.

Následně bylo přidáno 350 µl neutralizačního roztoku a zkumavky se promíchaly převrácením před vložením do centrifugy (10 minut, 16 000 × g, pokojová teplota). Po centrifugaci byl čistý lyzát přenesen na kolonku s aktivovaným sklem. Následovala centrifugace lyzátu (1 minuta, 16 000 × g, pokojová teplota), po odstranění supernatantu následovaly dva promývací kroky - nejprve bylo přidáno 750 µl promývacího roztoku (1 minuta, 16 000 × g, pokojová teplota), poté 250 µl promývacího roztoku (2 minuty, 16 000 × g, pokojová teplota). Kolonky byly následně přesunuty do čistých 1,5 ml zkumavek a bylo přidáno 100 µl ultračisté vody. Po 1 minutě inkubace v pokojové teplotě byla provedena závěrečná eluce DNA z kolonky (1 minuta, 16 000 × g, pokojová teplota).

Plasmid DNA Purification NucleoBond® Xtra Midi/Maxi (Macharey-Nagel):

Princip izolace plasmidové DNA z většího objemu (100 ml původního kultivačního objemu, midiprep) je obdobný jako u miniprepu, ovšem u midiprepu se používají dva typy kolonek - první typ obsahuje silikátové kuličky s navázaným methyl-amino-ethanolem, který je kladně nabitý a snadno tak váže záporně nabitou DNA, druhý typ obsahuje aktivované sklo (stejně jako u miniprepu).

Postup purifikace plasmidové DNA začal resuspendováním buněk v 8 ml resuspendačního roztoku, následovala lyze buněk přidáním 8 ml lyzačního roztoku, který obsahuje SDS a NaOH. Zkumavky byly promíchány lehkým převrácením a po 5 minutách inkubace při pokojové teplotě bylo přidáno 8 ml neutralizačního roztoku, který obsahuje octan draselný (CH₃COOK), ten je zodpovědný za renaturaci plasmidové DNA. Dále byla kolonka s methyl-amino-ethanolem ekvilibrována za pomoci 12 ml ekvilibračního roztoku, poté byl nanesen lyzát. Následovalo promývání kolonky 8 ml promývacího roztoku a poté přidáním 5 ml elučního roztoku se plasmidová DNA uvolnila z kolonky. Dále bylo k eluované DNA přidáno 2,5 ml isopropanolu pro vysrážení solí ze vzorku a po 2 minutách inkubace při pokojové teplotě byl vzorek nanesen na kolonku s aktivovaným sklem. Posledním krokem bylo promytí navázané plasmidové DNA za pomoci 2 ml vychlazeného 70% ethanolu a prosátím vzduchu, nakonec byla plasmidová DNA uvolněna z kolonky za pomoci 250 - 700 µl ultračisté vody.

6.2.2.5 Polymerasová řetězová reakce (PCR)

PCR je metoda umožňující amplifikaci určitého úseku DNA. PCR se skládá z opakujících se cyklů, v průběhu nichž dochází k nasedání přímých a zpětných primerů na DNA vlákna a prodlužování těchto vláken pomocí DNA polymerasy pocházející z termofilních organismů. V rámci jednoho cyklu dochází k periodickým změnám teplot, které zprostředkovává stroj určený na PCR reakce - cykler. PCR zahrnuje celkem 4 kroky:

- 1) Denaturace DNA - díky vyšší teplotě se rozvolní vodíkové vazby mezi dvoušroubovicí DNA a dojde k rozpletení na dvě jednořetězcová vlákna, teplota je v rozmezí 90 - 95 °C.
- 2) Hybridizace primerů - při poklesu teploty dochází k nasedání primerů na rozpletenou DNA.

- 3) Amplifikace DNA - teplota roste na optimální teplotu použité DNA polymerasy, dochází k amplifikaci úseku DNA ve směru 5' → 3' a nově nasyntetizovaný úsek DNA je komplementární k původnímu úseku DNA, pro tento krok se používá různá teplota, dle použité polymerasy.
- 4) Závěrečná polymerace - posledních několik minut celé metody, kdy dochází k dosyntetizování řetězců, teplota závisí na použité polymerase.

PCR byla použita pro místně-specifickou mutagenезi, konkrétní podmínky a složení reakcí jsou uvedeny v následující kapitole.

6.2.2.6 PCR zprostředkovaná místně-specifická mutagenезe plasmidové DNA (kit Q5 E0554S)

Místně-specifická mutagenезe pomocí PCR se používá k modifikaci sekvence DNA (nejčastěji genu) za účelem pozměnění aminokyselinové sekvence exprimovaného proteinu, těmito modifikacemi může být jedno- či více-aminokyselinová záměna, delece aminokyselin nebo jejich inserce. V prvním kroku jsou mutace do sekvence původního genu kódující daný protein vnášeny pomocí PCR se speciálně navrženými primery. Druhým krokem je odstranění templátových methylovaných vláken DNA pomocí enzymu *DpnI*, nově amplifikovaná DNA není methylována, proto štěpení enzymem *DpnI* nepodléhá.

Mutagenезe pomocí komerčního kitu Q5 E0554S je oproti klasické PCR zprostředkované mutagenезi, kde vznikají cirkulární produkty, specifická tím, že vyžaduje do PCR reakce primery, jejichž 5' konce na sebe plynule navazují. Výsledný PCR produkt je tedy lineární a musí být navíc provedena reakce na cyklizaci produktu. Postupováno bylo dle protokolu výrobce. Složení reakce a podmínky PCR jsou uvedeny v tab. 4 a tab. 5.

Po proběhlé PCR byla provedena kinasa, ligasa, *DpnI* reakce (KLD reakce). Kinasa ve směsi slouží k fosforylaci 5' konce PCR produktu, aby mohlo dojít k ligaci obou konců. KLD reakce probíhala *in vitro*, složení reakce uvádí tab. 6. Reagencie na KLD reakce byly smíchány ve zkumavce a inkubovány při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Po inkubaci byla směs (5 µl) transformována do buněk *E.coli* NEB 5-alpha (viz. kapitola 6.2.2.3).

Tab. 4: Složení PCR reakce pro místně-specifickou mutagenezi plasmidové DNA.

Složka PCR reakce	Objem na reakci
Q5 Hot Start High-Fidelity 2× Master Mix	6,25 µl
Přímý primer (10 µM)	0,625 µl
Zpětný primer (10 µM)	0,625 µl
Templátová DNA	0,5 µl
Sterilní voda	4,5 µl

Tab. 5: Podmínky PCR pro místně-specifickou mutagenezi plasmidové DNA.

Krok	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	98 °C	30 s
25 cyklů	98 °C	10 s
	55/63/72 °C	30 s
	72 °C	3 min
Dosyntetizování řetězců	72 °C	2 min

Tab. 6: Složení reakce na cyklizaci plasmidové DNA.

Složka KLD reakce	Objem na reakci
PCR produkt	0,5 µl
2× KLD reakční pufr	2,5 µl
10× KLD enzymový mix	0,5 µl
Sterilní voda	1,5 µl

6.2.2.7 Ověření vložení mutací za pomoci sekvenování

Vyizolovaná plasmidová DNA byla sekvenována za účelem ověření vnesení cílené mutace na servisních pracovištích (Eurofins Genomics, nebo Středisko sekvenování DNA - pracoviště Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i.). K sekvenaci byl použit pET univerzální primer 2 (UP2) a T7 terminální primer (tab. 3, kap. 6.1.7), výsledná koncentrace odpovídala 5 µM každého primeru na reakci, vyizolované plasmidy byly ve výsledné koncentraci 80 - 100 ng · µl⁻¹. Získané sekvence byly vyhodnoceny za pomoci programu Geneious verze 5.5.9.

6.2.3 Práce s rekombinantními proteiny

6.2.3.1 Stanovení koncentrace proteinů spektrofotometricky

Na určení koncentrace proteinů byl použit přístroj NanoDrop ND-800 (Thermo Fisher Scientific). Metoda byla popsána již v kapitole 6.2.2.1. Koncentrace proteinů se měří při vlnové délce 280 nm, v této vlnové délce totiž nejvíce absorbují elektromagnetické záření. U proteinů je ještě důležité znát jejich molární hmotnost a extinkční koeficient, obě dvě veličiny jsou důležité pro přesné určení koncentrace. Molární hmotnost se dá snadno zjistit sečtením molárních hmotností všech aminokyselin proteinu, je důležité připočítat i případné značení (např. His-tag apod.) a další přidané aminokyseliny. Extinkční koeficient udává, kolik daný protein absorbuje UV záření při vlnové délce 280 nm, lze ho zjistit ze sekvence proteinu za použití softwarů, které tuto hodnotu automaticky vypočítají.

6.2.3.2 Heterologní produkce proteinů

Heterologní produkce proteinů začíná vložením expresního konstruktů (plasmidu s vloženým genem kódujícím daný protein) do heterologního hostitele za pomoci transformace (kap. 6.2.2.3). Nejčastěji používaným expresním systémem je G- bakterie *Escherichia coli*, její kultivace je finančně i časově nenáročná a proteiny se produkují v dostatečném množství.

5 - 10 ml noční transformované kultury bylo přeočkováno do 1 l čerstvého LB tekutého média se stejnými selekčními antibiotiky ($30 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ kanamycin, *E. coli* BL21(DE3) - produkce proteinu LmbW; $30 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ kanamycin a $34 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ chloramfenikol, *E. coli* BL21(DE3)/pGroESL - produkce proteinů LmbY, Por15 - včetně mutantních variant) tak, aby výchozí OD_{600} kultivace byla v rozmezí 0,1 - 0,2. Pro kultivaci bakterií nadprodukcujících proteiny určené ke krystalizaci (LmbW a Por15) bylo použito obohacené LB médium (kap. 6.1.10), které umožňuje růst bakterií do vyšší OD. Kultivace probíhala v třepačce při 37 °C, 180 RPM až do konce exponenciální fáze růstu ($\text{OD}_{600} = 0,6 - 0,8$), poté byla za pomoci IPTG (finální koncentrace 0,4 mM) indukována exprese vloženého genu v plasmidu. Expese všech rekombinantních proteinů probíhala v třepačce v 17 °C, 180 RPM, po dobu 20 hodin. Další den následovalo oddělení média od buněk za pomoci centrifugace (40 minut, $10\,000 \times g$, 4 °C), buňky byly dále uloženy v -20 °C, nebo se s nimi bezprostředně po centrifugaci pracovalo (viz. kap. 6.2.3.3).

6.2.3.3 Uvolnění proteinů z buněk za pomoci ultrazvuku

Ultrazvuková sonikace je jednou z metod, jak dezintegrovat bakteriální buňky a extrahovat tak produkovaný, intracelulární protein ven z cytosolu. Ultrazvukové pulsy naruší buněčnou stěnu, která se rozpadne a umožní se tak vylíít celého cytosolu buňky do okolí.

Buňky s nadprodukovanými proteiny byly resuspendovány v sonikačním pufru (20mM Tris-HCl, 100mM NaCl, pH 8,0) s 5mM imidazolem ($1/20$ původního kultivačního objemu), následovala samotná sonikace ultrazvukovým homogenzátorem (Ultrasonic Homogenizer 4710, Cole-Parmer). V 50-ml centrifugačních zkumavkách (Falcon) bylo vždy 25 ml suspenze buněk se sonikačním pufrem. Sonikace probíhala 3×30 sekund a 1×60 sekund s tím, že zkumavky byly celou dobu uloženy v ledové lázni a mezi jednotlivými pulsy byla vždy pauza nejméně 1 minutu, aby nedošlo k přehřátí suspenze a potenciální degradaci proteinu. Sonikované buňky byly centrifugovány (20 minut, $10\,000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) a dále se pracovalo se supernatantem obsahujícím nadprodukované proteiny.

6.2.3.4 Chromatografické metody purifikace rekombinantních proteinů

6.2.3.4.1 Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie je metoda využívaná na vychytávání cílového proteinu z roztoku za pomoci vratné vazby proteinu na ligand vázaném na sorbent uvnitř chromatografické kolony. Pomocí promývacích roztoků, které odmyjí nečistoty a následně elučního roztoku s nižší iontovou silou, který umožní navázaný protein vyvézat z kolony, lze získat protein o poměrně vysoké čistotě.

Purifikované proteiny (LmbW, LmbY a Por15 - včetně mutantních variant) byly shodně produkovány s histidinovou kotvou na C-konci proteinu (His-tag se sekvencí LEHHHHHHHH). K purifikaci byly použity kolony HiTrapTM HP 1ml (purifikace proteinů pro *in vitro* testy) a HiTrapTM HP 5ml (purifikace proteinů pro krystalizaci). Uvnitř kolony se nachází chromatografická agaróza s navázanou kyselinou nitrilotrioctovou (NTA), která váže ionty niklu (Ni-NTA), dvě vazby niklu zůstávají volné pro interakci s His-tagem proteinu, dochází tedy ke specifické vazbě proteinů označených His-tagem. Kolony byly nejprve nabity promytím jedním objemem kolony (CV - z anglického column volume) roztokem 1M NiSO₄. Dále byly kolony promyty 5 CV destilované vody a následně 5 CV sonikačního pufru (20mM Tris-HCl, 100mM NaCl, pH 8,0) s 5mM imidazolem, poté byl nanesen supernatant získaný sonikací a následnou centrifugací buněk s nadprodukovanými proteiny. Purifikace proteinů určených k *in vitro* testům (LmbY, Por15 - včetně mutantních variant) byla prováděna z 1 l původního kultivačního objemu, proteiny určené ke krystalizaci (LmbW, Por15) byly purifikovány z 10 - 15 l původního kultivačního objemu. Po nanesení supernatantu na kolonu následoval promývací krok k odstranění nežádoucích proteinů a jiných nečistot navázaných na protein. Kolona byla

promyta 5 CV promývacího pufru se 75mM imidazolem (LmbY, Por15 - včetně mutantních variant), nebo se 100mM imidazolem (LmbW). Posledním krokem byla eluce za pomoci 5 CV elučního pufru s 250mM imidazolem (LmbY, Por15 - včetně mutantních variant), nebo s 300mM imidazolem (LmbW). Ještě vyšší koncentrace imidazolu způsobila rozrušení vazeb mezi niklem a histidinem proteinu, přes histidin navázané proteiny se tedy uvolnily z kolony, protein byl zachytáván do centrifugační zkumavky s kolonkou (Amicon® 30K - celkový objem 5 nebo 15 ml, dle použité kolony), za pomoci centrifugace byl následně postupně ve 3 cyklech vyměněn pufr, ve kterém byl protein eluován do sonikačního pufru bez imidazolu. Protein byl na stejné koloně finálně zakoncentrován do požadovaného objemu či koncentrace.

6.2.3.4.2 Rozměrově-vylučovací chromatografie - gelová filtrační chromatografie

Proteiny, které se produkovaly za účelem následné krystalizace (LmbW, Por15), byly ještě po afinitní chromatografii přečištěny za pomoci další chromatografické metody - gelové filtrační chromatografie.

Tato metoda je založená na separaci molekul na základě jejich velikosti. Kolona používaná pro tuto metodu má uvnitř matrix obsahující póry a kanálky definovaných velikostí, do kterých se dostávají malé molekuly a ty jsou také uvolňovány při eluci jako poslední, naopak velké molekuly, které se do pórů nevejdou, jsou eluovány jako první.

Na gelovou filtraci byla použita kolona ENrich™ SEC 650 10 × 300 mm (Bio-Rad), která má vnitřní objem 24 ml. Dále byl použit kapalinový chromatograf Akta Purifier (GE Healthcare Life Sciences). Průtok mobilní fáze byl 1 ml · min⁻¹, při nanášení proteinu byl průtok 0,5 ml · min⁻¹. Nejprve byla kolona ekvilibrována 3 CV pufru pro gelovou filtraci (20mM Tris-HCl, 100mM NaCl, pH 8). Poté se naněsl vzorek přefiltrovaného (0,22 μm filtr) proteinu (200 μl nebo 1 ml, dle velikosti použité nanášecí smyčky), následovala isokratická eluce vzorků. Celkový eluční objem byl 30 ml, frakce byly jímány po 1 ml za pomoci automatického sběrače frakcí BioFrac Fraction Collector (Bio-Rad). Pomocí záznamu absorbance při 280 nm z chromatogramu bylo určeno, v jakých frakcích se protein nachází a jeho identita byla následně potvrzena za pomoci SDS-PAGE elektroforézy (kapitola 6.2.3.5). Frakce obsahující čistý vyizolovaný protein byly spojeny a zakoncentrovány na finální koncentraci 15,4 - 16,8 mg · ml⁻¹. Pufr, ve kterém byl protein eluován byl následně použit jako výchozí pufr pro krystalizační experimenty.

6.2.3.5 SDS-PAGE elektroforéza

Podobně jako u agarózového DNA gelu, principem metody je putování nabitých molekul k elektrodě s opačným nábojem v elektrickém poli. Jde o separaci proteinů na základě jejich velikosti náboje, proteiny s nižším povrchovým nábojem putují v gelu rychleji, mají totiž menší odpor. Proteiny jsou nejprve denaturovány za pomoci SDS a vyšší teploty. SDS se rovnoměrně naváže na denaturovaný protein, ten se stává záporně nabitým. Na tuto metodu se používá polyakrylamidový gel (PAGE = Polyakrylamid Gel Electrophoresis), který je tvořen ze dvou částí - zaostřovacího a separačního gelu (jejich složení uvádí tab. 7). Zaostřovací gel obsahuje nižší koncentraci polyakrylamidu a slouží k tomu, aby se proteiny dostaly do separačního gelu ve stejný čas a vytvořil se tak pravidelný, rovný pás putujících proteinů. V separačním gelu se rychlost proteinu mění v závislosti na povrchovém napětí, obsahuje vyšší koncentraci polyakrylamidu a proteiny zde putují pomaleji než v zaostřovacím gelu. Za pomoci standardizovaného markeru se poté vyhodnotí velikost testovaného proteinu.

Vzorky pro SDS-PAGE elektroforézu byly připraveny následovně: protein byl smíchán s 2 × koncentrovaným SDS-vzorkovým pufrem v poměru 1:1 a inkubován v termobloku (80 °C) po dobu 20 minut. Vzorky byly nanášeny po úplném zchladnutí. Při přípravě gelu bylo postupováno následovně: připraven a nalit byl nejprve separační gel, který byl převrstven destilovanou vodou. Po 30 minutách byl gel zpolymerován a pomocí filtračního papíru byla odstraněna voda, následně byl gel převrstven zaostřovacím gelem, do kterého byl shora vložen hřebínek definující jamky pro nanášení vzorků. Po zpolymerování (~ 30 minut) byl hřebínek odstraněn. Elektroforéza probíhala v SDS-elektrodovém pufru, jako zdroj napětí byl použit Electrophoresis power supply EPS 500/400 (Pharmacia). Prvních 10 minut probíhala separace pod napětím 90 V, jakmile vzorky sestoupily do separačního gelu, napětí bylo zvýšeno na 150 V. Separace byla ukončena, jakmile pás vzorků doputoval ke spodnímu okraji gelu. Jako standard molekulových velikostí proteinů byl použit PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, product #26619). Separované proteiny byly zviditelněny pomocí barvicího roztoku (60 - 80 mg barvy Coomassie Brilliant Blue G-250 se rozpustilo v 1 l destilované vody za stálého míchání po dobu 3 hodin, poté bylo do barvy přidáno 3 ml HCl a barva se promíchávala dalších 10 minut). Tato metoda barvení specificky barví pouze proteiny, není tedy třeba speciálně odmyvat pozadí. Obarvený gel byl pouze ponořen do destilované vody, která byla v průběhu 1 hodiny 3 × vyměněna (odstranění přebytečné barvy).

Tab. 7: Složení zaostřovacího a separačního gelu na SDS-PAGE elektroforézu.

Složka	Množství	
	Zaostřovací gel	Separací gel (10%)
Akrylamid	112 μ l	1 250 μ l
Pufr Tris-HCl (pH 8,9)	-	1 000 μ l
Pufr Tris-HCl (pH 6,9)	126 μ l	-
Deionizovaná voda	875 μ l	2 625 μ l
SDS (4%)	32 μ l	125 μ l
APS (30%)	2,5 μ l	5 μ l
TEMED	2,5 μ l	5 μ l

6.2.4 Specializované metody určené k charakterizaci proteinů

6.2.4.1 Testování enzymatické aktivity proteinů

6.2.4.1.1 *In vitro* testování mutovaných proteinů LmbY a Por15

Enzymatická aktivita mutovaných proteinů LmbY a Por15 byla testována v reakcích o celkovém objemu 30 μ l. Reakce obsahovala následující reagenty: látku **5a** (kap. 6.1.2) jako substrát (koncentraci substrátu nelze stanovit, neboť se jedná o látku extrahovanou z bakterií a standard není k dispozici), reakční pufr (500mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0), kofaktor F₄₂₀ (finální koncentrace 10 μ M), aktinobakteriální glukosa-6-fosfát dehydrogenasu (FGD, finální koncentrace 0,1 mM), glukosa-6-fosfát (G-6-P, finální koncentrace 2,5 mM) a testovaný protein (finální koncentrace 120 – 180 μ M). FGD a G-6-P v reakci slouží k regeneraci kofaktoru F₄₂₀. Reakce probíhala 1 hodinu při 28 °C, poté byla ukončena přidáním HCOOH (finální koncentrace 2 %). Centrifugací se oddělil precipitát (1 minuta, 13 000 \times g, pokojová teplota), supernatant byl napipetován do čisté zkumavky a ihned odpařen ve SpeedVacu při teplotě 30 °C. Bezprostředně před UHPLC-MS (vysoce účinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií) analýzou byly vzorky resuspendovány v 30 μ l 50% methanolu. Jako negativní kontrola byly připraveny reakce bez testovaného proteinu (chybějící objem do reakce byl doplněn ekvivalentním množstvím vody). Jako pozitivní kontrola byly připraveny reakce s nemutovanými proteiny LmbY a Por15.

6.2.4.1.2 Ultra čistá kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií

Jednou z používaných analytických metod pro oddělení a identifikaci jednotlivých složek ve směsi vzorku je kapalinová chromatografie. Dělené látky procházejí chromatografickou kolonou jinou rychlostí, to je způsobeno tím, že každá látka směsi interaguje se stacionární fází uvnitř kolony jinak.

Mobilní fáze slouží k posouvání vzorku kolonou. Podle toho, jak rychle jednotlivé látky projdou kolonou je určen jejich retenční čas (t_R). Při samotné separaci jsou jednotlivé složky detekovány UV-VIS detektorem, dále se s výhodou používá on-line zapojení s hmotnostním spektrometrem, který určí identitu separovaných látek na základě jejich molekulové hmotnosti. Principem metody je převedení analyzovaného vzorku do nabitého (ionizovaného) stavu. Hmotnost separované látky je určena za pomoci měření poměru hmota/náboj (m/z) jejího iontu ve vakuu.

Pro analýzu byl využit kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem 6546 LC/Q-TOF systém (Agilent Technologies). Vzorky s *in vitro* reakcemi byly separovány pomocí reverzní fáze (nepolární stacionární fáze a polární mobilní fáze) na koloně Acquity UPLC CSH C18, 1,7 μm , 2,1 mm \times 50 mm při teplotě 40 °C. Použitá mobilní fáze byla dvousložková: 0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí (A) a acetonitril (B). Na kolonu bylo dávkováno 5 μl vzorku, rychlost mobilní fáze byla 0,4 ml \cdot min⁻¹. Pro separaci byla použita lineární gradientová eluce: čas [min]/% B - 0/5, 1,5/5, 10/45,9; 1,5 min výplach kolony (100 % B); 1,5 min ekvilibrace kolony (5 % B). Podmínky pro detekci za pomoci hmotnostní spektrometrie jsou uvedeny v tab. 8. Referenční látky pro analýzu byly 9H-purin (2 ng \cdot μl^{-1}) a hexakis(1H,1H,3H-perfluoropropoxy)fosfazen (2 ng \cdot μl^{-1}). Chyba analýzy MS detektoru byla udržována pomocí referenční látky pod 5 ppm. Chromatogramy byly extrahovány pro [M+H]⁺ ionty analytů s velikostí tolerančního okna 0,05 Da.

Tab. 8: Podmínky detekce analyzovaných látek za pomoci hmotnostní spektrometrie.

Podmínka MS detekce	Nastavená hodnota
Interval měřených hodnot	80 - 1000 m/z
Doba skenu	0,1 s
Pauza mezi skeny	0,01 s
Průtok retenční látky	5 $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$
Pauza mezi skeny pro referenční látku	0,1 s
Napětí vložené na kapiláru	2800 V
Napětí vložené na vstup do analyzátoru	40 V
Teplota dusíku	350 °C
Průtok dusíku (desolvatační plyn)	800 l \cdot h ⁻¹
Průtok dusíku při vstupu do analyzátoru	50 l \cdot h ⁻¹
Teplota bloku iontového zdroje	120 °C

6.2.4.2 Diferenciální skenovací fluorimetrie (nanoDSF)

Diferenciální skenovací fluorimetrie je biofyzikální metoda zkoumající stabilitu proteinů za využití vlastní fluorescence aromatických aminokyselin tryptofanu a tyrosinu. Proteiny jsou měřeny v jejich nativní konformaci, se zvyšující se teplotou se postupně protein rozbaluje, tyto změny ve struktuře proteinu se projeví na intenzitě a vlnové délce emise, zejména na fluorescenci tryptofanu. Detektor měří emitované záření ve dvou vlnových délkách zároveň - 330 a 350 nm, což umožňuje citlivější detekci. Protein je nejprve smíchán s testovaným pufrům, poté jsou vzorky nabrány do kapilár a vloženy do přístroje. Paprsek projde kapilárou s proteinem, pokud protein není agregovaný, odrazí se od nosiče kapilár a je zachycen detektorem. V případě, že vzorek obsahuje agregované částice, je světlo rozptýleno a signál odraženého paprsku je slabší. Výsledkem analýzy jsou hodnoty udávající míru fluorescence (poměr 350/330 intenzity fluorescence slouží jako funkce teploty) a jak se tato fluorescence mění v čase a z nich je vypočítávána teplota tání (T_m , z anglického melting temperature) pro každý vzorek. Teplota tání je definována jako teplota, při které je polovina proteinu již denaturována.

Metoda byla využita k testování stability proteinu LmbW v různých pufrách. 9 μl testovaného pufru (testováno bylo celkem 112 pufrů - kapitola 6.1.11) bylo smícháno s 1 μl proteinu LmbW (finální koncentrace LmbW byla $1,6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), z mikrozkušavky byl poté vzorek vtažen skleněnou kapilárou Prometheus NT.48 Series nanoDSF Grade Standard Capillaries (NanoTemper Technologies), k analýze byl použit přístroj Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies). Parametry měření byly nastaveny následovně - rozmezí teplot: $20 \rightarrow 80 \rightarrow 20 \text{ }^\circ\text{C}$, rychlost teplotní změny: $1,5 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$.

6.2.4.3 Dynamický rozptyl světla (DLS - Dynamic Light Scattering)

Metoda dynamického rozptylu světla slouží k měření velikosti molekul ve vzorku, a jak se tato velikost mění v čase. Principem metody je měření Brownova pohybu za pomoci laseru, v určitých časových intervalech dochází k měření a porovnání s předchozím měřením, jde tedy o měření profilu distribuce velikosti částic v čase. Menší částice se v roztoku pohybují rychleji, mají tedy větší kinetickou energii, a tím při měření vznikají vyšší intenzity fluktuace laseru. Vztah mezi rychlostí pohybu částic a jejich velikostí je dán Stokesovou-Einsteinovou rovnicí:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H}$$

D Difuzní koeficient = udává rychlost částic [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]

k_B Boltzmannova konstanta = $1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$

T.... Absolutní teplota [K]

η Dynamická viskozita [$\text{kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]

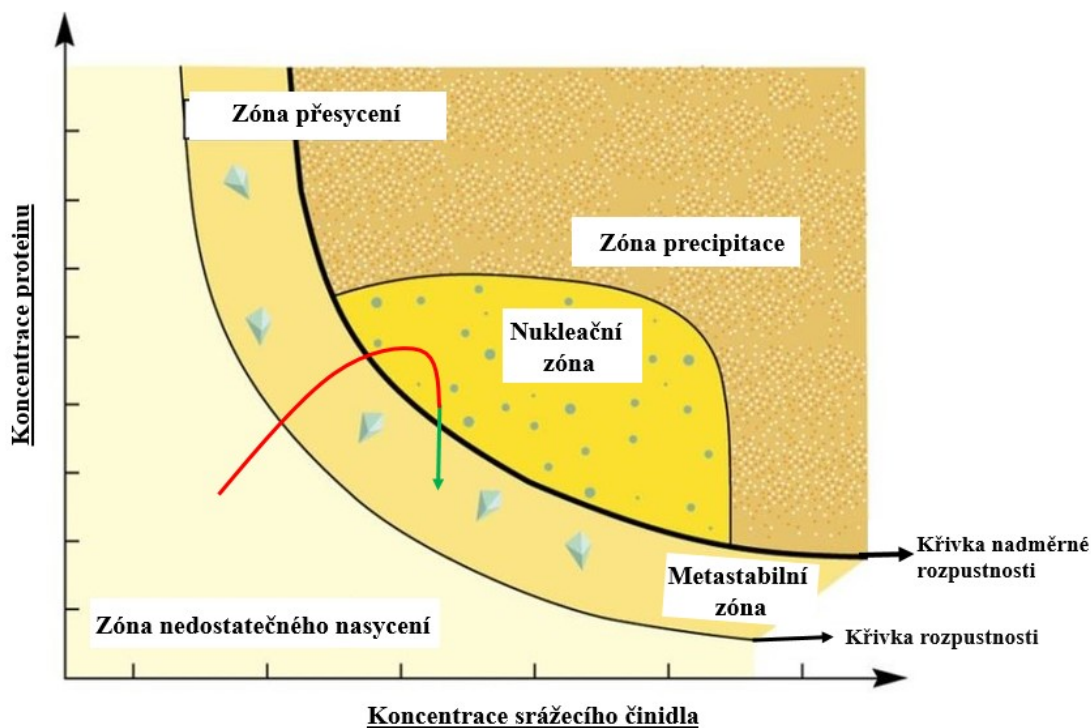
R_H Hydrodynamický poloměr částic [m]

Důležité parametry při měření, které mohou ovlivnit výsledky, jsou teplota a viskozita vzorku, teplota je v přístroji udržována konstantní (4 °C), ovšem při vyšší viskozitě pufru (například pokud obsahuje glycerol) může dojít k nepřesnému měření. Výchozí data měření jsou grafy, které zobrazují velikost částic v roztoku v závislosti na čase a jak se tato velikost mění, dále histogram zobrazující pík nebo píky, které představují v kolika formách (monomer/dimer/tetramer) se protein v daném pufru nachází. Pokud se velikost částic v čase nemění, jedná se o protein, který se nesráží a nachází se pouze v jedné formě - je tedy monodisperzní. Tato vlastnost proteinu je velice důležitá pro následnou krystalizaci, kdy je větší úspěšnost krystalizace, pokud protein neagreguje a nachází se jen v jedné formě (ať už se jedná o monomer, dimer či další formy).

Pro analýzu byl 1 µl purifikovaného LmbW naředěn 9 µl testovaného pufru (finální koncentrace LmbW 1,6 mg · ml⁻¹), následně byly 2 µl ze vzorku nanесeny na testovací destičku. K analýze byl použit přístroj SpectroLight 600/610 (Xtal Concepts). Vzorky byly testovány v triplicátech. Celková doba analýzy byla nastavena na 14 hodin s intervalem měření 10 minut.

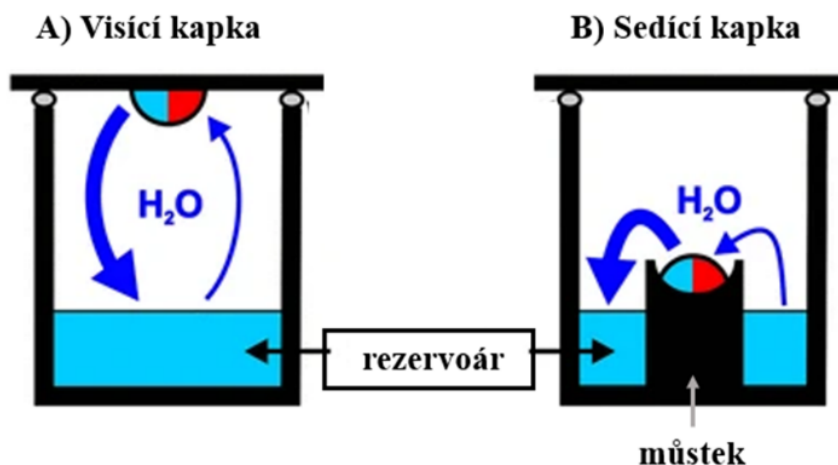
6.2.5 Příprava krystalů Por15 a LmbW

Krystalizace je proces tvorby krystalů proteinu, který má tři fáze (obr. 26) - první fází je nukleace, kdy jsou ionty správně orientovány vůči sobě a dojde k jejich kontaktu, poté se tvoří submikroskopická jádra, ovšem jen v případě, že dojde k přesycení roztoku. Druhou fází je růst krystalů, krystaly rostou jen za podmínky, že je roztok stále přesycený. Poslední a třetí fází je zastavení růstu krystalu, k tomuto jevu dochází při navození rovnováhy, když se roztok přiblíží hranici rozpustnosti proteinu (shrnutí v McPherson & Gavira, 2014).



Obr. 26: Fázový diagram proteinové krystalizace za pomoci difuze vodních par, osa x zobrazuje stoupající koncentraci srážecího činidla, osa y zobrazuje stoupající koncentraci proteinu, červenou křivkou je zobrazena první fáze krystalizace, kdy dochází k nukleaci (= přechod do nukleační zóny) - předchod ze stavu nedostatečného nasycení do stavu přesyčení, zeleně je vyznačena druhá fáze krystalizace, tedy růst krystalů podmíněný přechodem z nukleační zóny do metastabilní zóny, ve které dochází k samotnému růstu krystalů. Třetí fáze - tedy zastavení růstu krystalů představuje konec zelené šipky (převzato a upraveno z Pichlo et al., 2016).

Existují dvě základní uspořádání krystalizace - krystalizace v tzv. sedící a visící kapce. Sedící kapka je umístěna na speciální můstek, který jej odděluje od rezervoáru pod ním. Visící kapka je nanášena na víčko, které jamku naplněnou rezervoárem shora uzavírá (obr. 27). Princip je analogický: v obou uspořádáních je celá jamka vzduchotěsně uzavřena, díky odlišnému tlaku vodních par nad jednotlivými složkami dochází k přechodu těchto par až do jejich vyrovnání.



Obr. 27: Zobrazení dvou základních uspořádání krystalizace za pomoci difuze vodních par - A - visící kapka, kdy se kapka nachází na skleněném víčku, B - sedící kapka, kde je šedou šipkou vyznačen můstek držící kapku. Červená část kapky představuje protein a modrá část srážecí činidlo, modrými šipkami je vyznačen směr difuze vodních par (převzato a upraveno z Bijelic & Rompel, 2018).

6.2.5.1 Nalezení základních krystalizačních podmínek proteinu LmbW

Pro zjištění základních podmínek, ve kterých protein LmbW krystalizuje, byly použity komerční kity krystalizačních pufrů (metoda sedící kapky, 1 sada = 96 různých podmínek): BCS Screen (Molecular Dimensions), JCSG+ Suite (Qiagen), Morpheus® screen (Molecular Dimensions), Morpheus® II screen (Molecular Dimensions), PACT premier™ (Molecular Dimensions), SG1™ Screen (Molecular Dimensions) a XP Screen (Jena Bioscience). Protein byl nanášen na krystalizační destičku (CRYSTALQUICK SW PLATE, Item No.: 609101, Greiner Bio-One) roboticky (Dropsetter NT8, Formulatrix) ve třech různých poměrech protein:srážecí činidlo - 1:2, 1:1 a 2:1. Velikost kapky byla 300 nl, objem rezervoáru činil 320 μ l. Pro inicializační test byl použit protein o koncentraci 16,8 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Po nanesení proteinu byla destička uzavřena fólií a umístěna do krystalizačního hotelu RI1000 (Formulatrix), krystalizace probíhala při konstantní teplotě 20 °C. Detekce růstu krystalů probíhala automatickým fotografováním destiček ve stanovených časových intervalech. Snímky byly pořizovány celkem ve 3 různých módech - viditelné světlo, UV světlo a polarizované světlo. UV světlo a polarizované světlo slouží k odlišení krystalů solí a proteinových krystalů, které pod UV zářením emitují záření díky přítomnosti aromatických aminokyselin tryptofanu a tyrosinu.

6.2.5.2 Optimalizace úspěšných podmínek poskytujících krystaly LmbW ve visící kapce

Při nalezení podmínek, při kterých vyrostl krystal proteinu LmbW, byly tyto podmínky interpretovány do visící kapky s cílem optimalizovat podmínku tak, aby poskytla více krystalů, případně krystaly větší velikosti a kvality vhodné pro difrakci. Protein byl ručně nanášen na krystalizační destičku s jamkami uzavíratelnými šroubovacím víčkem (EasyXtal, Qiagen), ve čtyřech různých poměrech protein:srážecí činidlo - 1:1, 1:2, 2:1 a 3:1. Velikost kapky byla 1 - 2 μl , objem rezervoáru činil 500 μl . Sledován byl vliv koncentrace proteinu na krystalizaci - testováno bylo koncentrační rozmezí 15 - 32 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, dále pak vliv koncentrace srážedla - PEG 4000 (25,5 - 30% w/v) a nakonec vliv přítomnosti předpokládaného substrátu (látka **2**) či kofaktoru SAM. Průběh krystalizace byl průběžně sledován za pomoci stereomikroskopu SZX-16 (Olympus).

6.2.5.3 Optimalizace úspěšných podmínek poskytující krystaly Por15 ve visící kapce

Základní podmínky poskytující růst krystalů Por15 byly již nalezeny v rámci předchozí studie (Steiningerová, 2020a), proto byly zvoleny pouze tři „iniciační“ screeny - BCS Screen (Molecular Dimensions), SG1™ Screen (Molecular Dimensions) a XP Screen (Jena Bioscience), které ale poskytly pouze jednu (v předchozí studii nepopsanou) podmínku, ve které rostly krystaly. Tato podmínka byla, analogicky jako u LmbW, interpretována do visící kapky, opět s cílem optimalizovat podmínku tak, aby poskytla více krystalů, případně krystaly větší velikosti a kvality vhodné pro difrakci. Protein byl ručně nanášen na krystalizační destičku s jamkami uzavíratelnými šroubovacím víčkem (EasyXtal, Qiagen), ve čtyřech různých poměrech protein:srážecí činidlo - 1:1, 1:2, 2:1 a 3:1. Velikost kapky byla 1 - 2 μl , objem rezervoáru činil 500 μl . Sledován byl vliv koncentrace proteinu na krystalizaci - testováno bylo koncentrační rozmezí 5 - 25 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, dále pak vliv koncentrace srážedla - PEG 400 (10 - 40% v/v), protein Por15 byl krystalizován v přítomnosti substrátu (látka **5a**) i kofaktoru F₄₂₀. Průběh krystalizace byl průběžně sledován za pomoci stereomikroskopu SZX-16 (Olympus).

6.2.5.2 Rentgenová analýza struktury proteinu

Rentgenová krystalografie představuje metodu na určení 3D struktury krystalu proteinu. Za pomoci rozptylu monochromatického rentgenového záření, které se odráží od krystalu proteinu, lze určit uspořádání atomů v krystalové mřížce. Krystal proteinu je schopný odrážet rentgenové záření, protože se chová jako difrakční mřížka.

Difrakce je jev, kdy při průchodu primárního rentgenového záření dochází k excitaci elektronů, které pak vysílají všemi směry sekundární záření, toto vlnění může v některých směrech zesílit nebo naopak umlčet rentgenové záření. Difrakce jako odraz rentgenového záření na rovinách mřížky krystalu lze vyjádřit za pomoci Braggovy rovnice (někdy také nazývaný jako Braggův zákon):

$$n\lambda = 2d \cdot \sin\theta$$

n... celé číslo vyjadřující zpoždění paprsku

λ ... vlnová délka rentgenového záření [nm]

d... mezivětrinná vzdálenost [nm]

θ ... difrakční úhel [°]

Rovnice nám říká, že k difrakci dojde pouze, pokud se odražený paprsek zpozdí vůči paprsku odraženému od vedlejší roviny o celý násobek jeho vlnové délky.

Při samotném měření dochází k otáčení krystalu, měření probíhá tedy na všech strukturních rovinách. Rozptyl paprsků je v podobě difrakčních skvrn zachycován na detektoru a na základě těchto skvrn je poté náročným výpočetním procesem vytvořen 3D model proteinu.

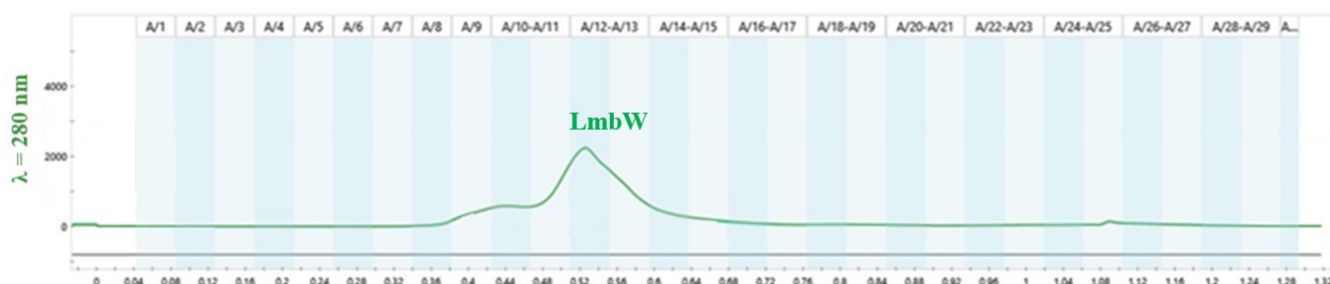
Difrakci krystalů proteinů LmbW a Por15 prováděl Ing. Jan Stránský, PhD. (Centrum molekulární struktury, AV ČR, v.v.i.). Měření byly pouze dostatečně velké krystaly, tedy aby ve všech směrech splňovaly délku alespoň 100 μm . Na vyjmutí krystalu byla použita smyčka o průměru 100 μm (MiTeGen), difrakce probíhala pomocí difraktometru D8 Venture (Bruker) s anodou vyrobenou z galia sloužící jako zdroj rentgenového záření (MetalJet D2, Excillum), s detektorem Photon II (Bruker) a s čtyřkruhovým goniometrem měnícím orientaci krystalu.

7. Výsledky

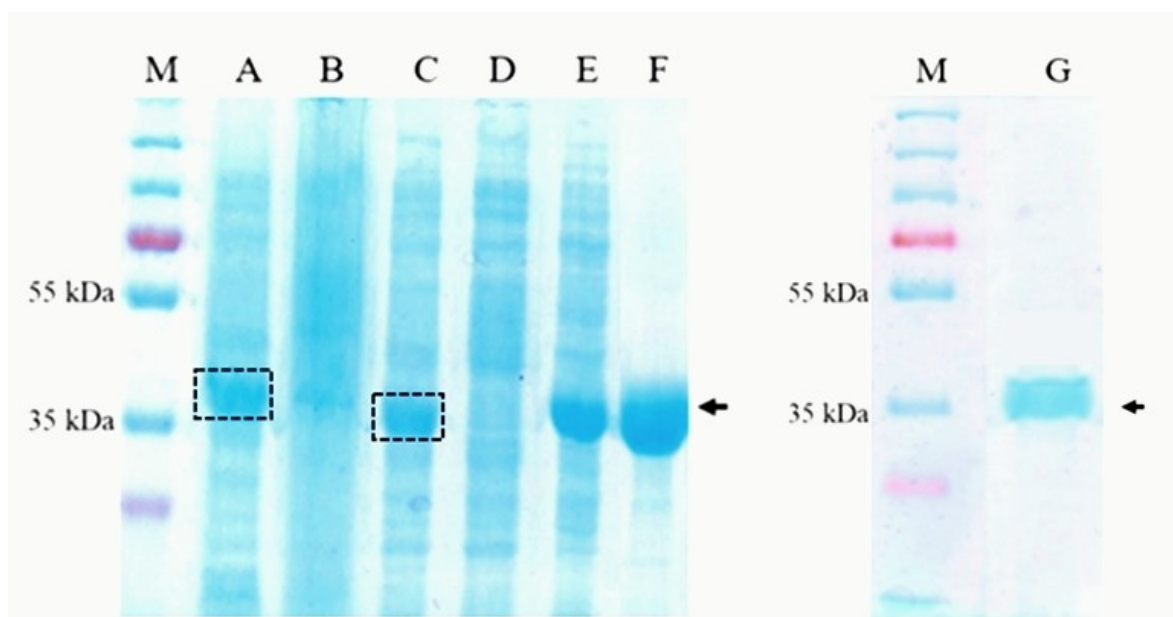
7.1 Determinace přirozeného substrátu LmbW za pomoci krystalografie

7.1.1 Produkce a purifikace proteinu LmbW

Základní podmínky produkce a purifikace proteinu LmbW byly stanoveny v rámci předchozí studie (Steiningerová, 2015). Tyto podmínky byly dále optimalizovány za účelem připravit protein v dostatečné kvantitě i kvalitě vhodné pro krystalizaci. Postup heterologní nadprodukce proteinu LmbW popisuje kap. 6.2.3.2. Po uvolnění proteinu z buněk ultrazvukovou sonikací následovala dvoustupňová purifikace: (1) afinitní chromatografie - z 1 l původního kultivačního objemu bylo průměrně získáno 4,2 mg proteinu LmbW a (2) gelová filtrace. Protein LmbW byl při gelové filtraci eluován z kolony ve frakci odpovídající 0,52 CV (obr. 28), průměrný výtěžek po druhém purifikačním kroku byl 3,2 mg (na 1 litr oúvodního kultivačního objemu). Ke kontrole produkce a jednotlivých kroků purifikace LmbW byla použita SDS-PAGE elektroforéza (obr. 29).



Obr. 28: Chromatogram - gelová filtrace proteinu LmbW, čísla A/1 - A/29 v horní části obrázku jsou vyznačeny jednotlivé frakce při eluci, zelený pík (vlnová délka 280 nm) zobrazuje, ve kterých frakcích se nachází protein LmbW.



Obr. 29: SDS-PAGE elektroforéza - produkce a purifikace LmbW, teoretická molární hmotnost pro LmbW - $M_w = 40,035$ kDa, černou šipkou/černým přerušovaným obdélníkem je označený LmbW, M = standard molekulové velikosti proteinů, A = celkové buněčné proteiny (indukce za pomoci IPTG), B = celkové buněčné proteiny - kontrola (bez indukce IPTG), C = rozpustná frakce proteinů (indukce IPTG), D = rozpustná frakce proteinů - kontrola (bez IPTG), E = frakce proteinů, které byly odmyty během afinitní chromatografie za pomoci pufru s 100mM imidazolem, F = purifikovaný LmbW - po afinitní chromatografii, G = purifikovaný LmbW - po gelové filtraci.

7.1.2 Stanovení stability proteinu LmbW

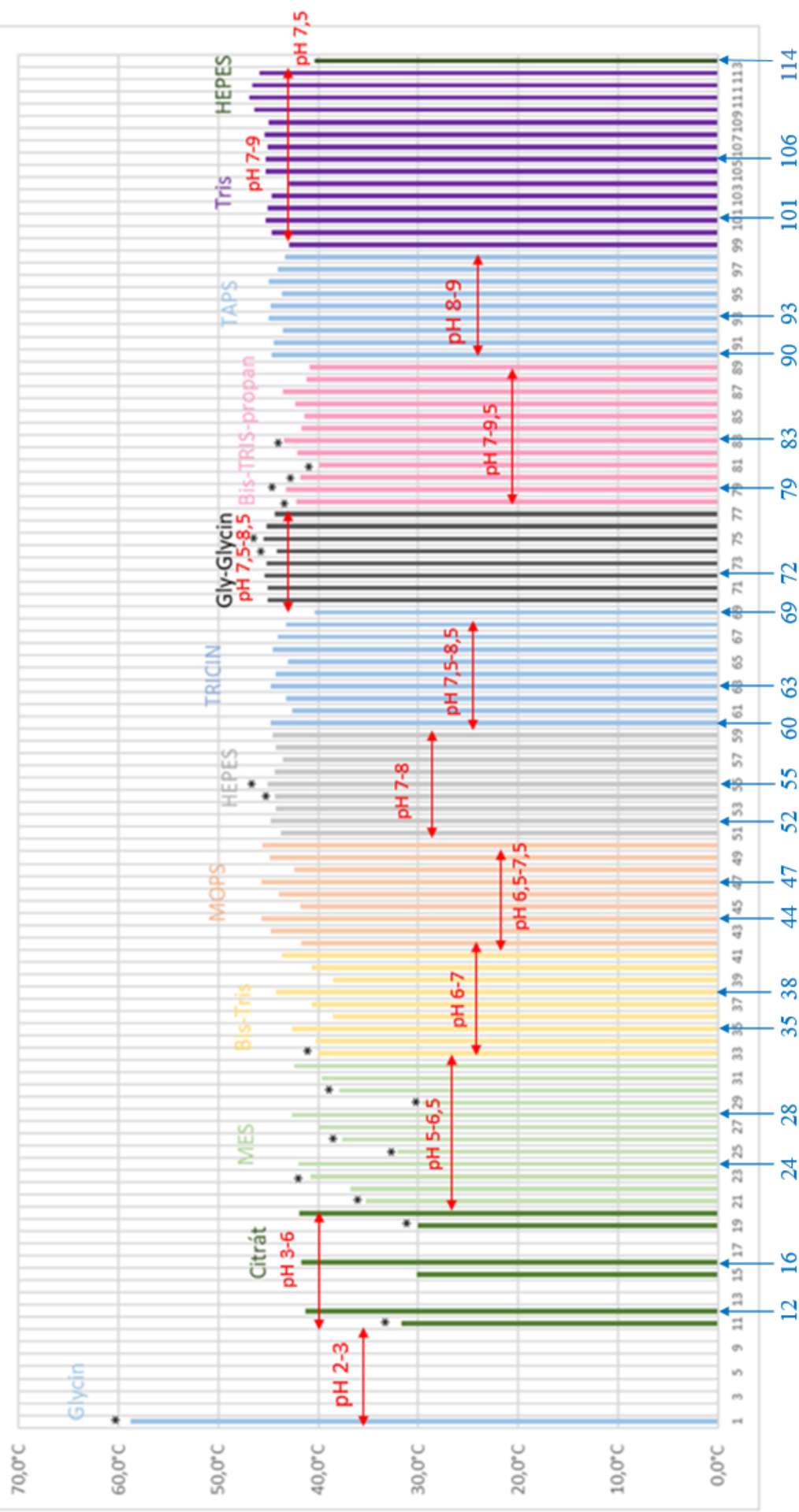
7.1.2.1 Testování stability LmbW v různých pufrch (nanoDSF)

Stabilita purifikovaného proteinu je pro krystalizaci klíčová - je prakticky nemožné krystalizovat proteiny, které ať už bezprostředně po purifikaci, či s krátkým odstupem času (řádově hodiny) agregují. Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda pufr zvolený pro purifikace (pufr dle Steiningerová, 2015 - základ: 20mM Tris-HCl, 100mM NaCl, pH 8,0) je pro tento protein vhodný, či zda existuje vhodnější alternativa.

Celkem bylo testováno 112 pufrů o různém chemickém složení (dle chemického složení rozděleny celkem do 11 skupin), pokrývající pH škálu v rozmezí 2,0 - 9,5 (seznam pufrů je uveden v kap. 6.2.11). V rámci každé skupiny byl testován vliv přítomnosti NaCl a dále NaCl společně s redukčním činidlem TCEP. Pomocí nanoDSF byla stanovena T_m u 101 podmínek (obr. 30). I po opětovných pokusech se nepodařilo T_m naměřit u následujících pufrů: 2 - 6, 9, 10, 13, 14, 17, 18. Důvodem byla viditelná agregace proteinu již po přidání testovaného pufru ke vzorku proteinu. Jelikož se jedná o pufrы s pH v rozmezí 2 - 4, je zřejmé, že nízké pH není pro protein LmbW vhodné. Naopak

nejvyšší hodnoty T_m byly naměřeny u pufrů s pH v rozmezí 6,5 - 8,5. Vůbec nejvyšších hodnot T_m , která tedy odpovídá nejvyšší stabilitě proteinu v dané podmínce, bylo dosaženo u pufru 111 (46,9 °C; 100mM Tris, 100mM NaCl, 15% glycerol, pH 8,0), pufru 112 (46,6 °C; 100mM Tris, 100mM NaCl, 15% glycerol, pH 8,5) a pufru 110 (46,4 °C; 100mM Tris, 100mM NaCl, 15% glycerol, pH 7,5). Tab. 9 níže přehledně shrnuje pufrы z každé skupiny s nejvyšší hodnotou T_m . Přítomnost NaCl a NaCl spolu s TCEP neměla na stabilitu vliv, nebyla nalezena žádná korelace - výsledky jsou různé u všech skupin pufrů.

Teploty tání (°C) u LmbW v testovaných pufrích (1-6, 9-114)



Obr. 30: Teploty tání LmbW v testovaných pufrích, (* označené – viditelný precipitát, jednotlivé skupiny pufrů jsou barevně odlišeny a červeně jsou uvedeny rozmezí hodnot pH, modrou šipkou a číslem jsou vyznačeny čísla pufrů s nejvyšší hodnotou T_m vybrané k dalším stabilitním testům.

Tab. 9: Pufr/y z každé „chemické“ skupiny s nejvyšší hodnotou T_m a jeho/jejich složení.

Skupina	Pufr č.	Složení	T_m
Citrát	16	82,5mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 17,5mM $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, 100mM NaCl, pH 6,0	41,7 °C
MES	28	100mM MES, 100mM NaCl, pH 6,5	42,6 °C
Bis-Tris	38	100mM Bis-Tris, 100mM NaCl, pH 7,0	44,2 °C
MOPS	44	100mM MOPS, pH 7,5	45,7 °C
	47	100mM MOPS, 100mM NaCl, pH 7,5	45,7 °C
HEPES	55	100mM HEPES, 100mM NaCl, pH 7,5	45,1 °C
TRICIN	60	100mM Tricin, pH 7,5	44,7 °C
	63	100mM Tricin, 100mM NaCl, pH 7,5	44,7 °C
Glycylglycin	72	100mM glycylglycin, 100mM NaCl, pH 7,5	45,4 °C
Bis-Tris-Propan	83	100mM Bis-Tris-propan, 100mM NaCl, pH 8,0	43,5 °C
TAPS	93	100mM TAPS, 100mM NaCl, pH 8,0	45,0 °C
Tris	106	100mM Tris, 100mM NaCl, pH 8,0	45,3 °C
Tris + glycerol	111	100mM Tris, 100mM NaCl, 15% glycerol, pH 8,0	46,9 °C

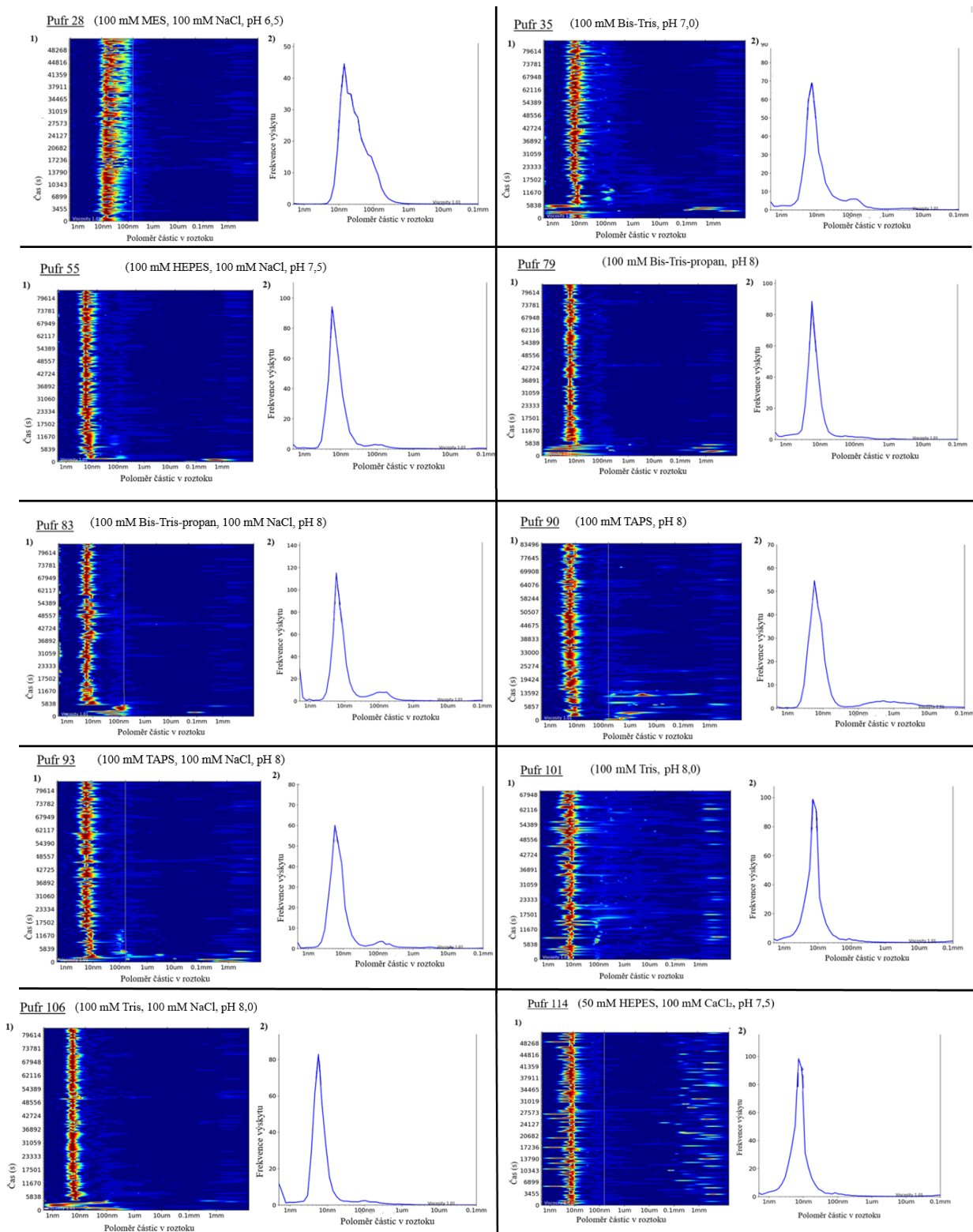
7.1.2.2 Stanovení disperzity LmbW (DLS)

Následující experiment byl proveden pro zjištění distribuce proteinu LmbW v pufrch, které na nanoDSF poskytly nejlepší výsledky. Konkrétně z každé skupiny pufrů byl vybrán pufr s nejvyšší hodnotou T_m (tab. 9) a k němu ještě totožný s/bez 100mM NaCl (NaCl může mít vliv na formu, ve které se protein v roztoku vyskytuje; Wowor et al., 2014). Doplňkově byl dále vybrán pufr 114 (50 mM HEPES, 100mM CaCl_2 , pH 7,5), neboť v literatuře je možné dohledat, že v pufru o podobném složení byly purifikovány či krystalizovány homologní proteiny LmbW (MrsA, MppJ; Braun et al., 2010; Zou et al., 2014). Z experimentu naopak byly vyřazeny pufr/y 109-113, které sice mají vysoké T_m , nicméně přítomnost 15% glycerolu v těchto pufrch zvyšující viskozitu vzorku by interferovalo s DLS, výsledky by tak byly značně nepřesné.

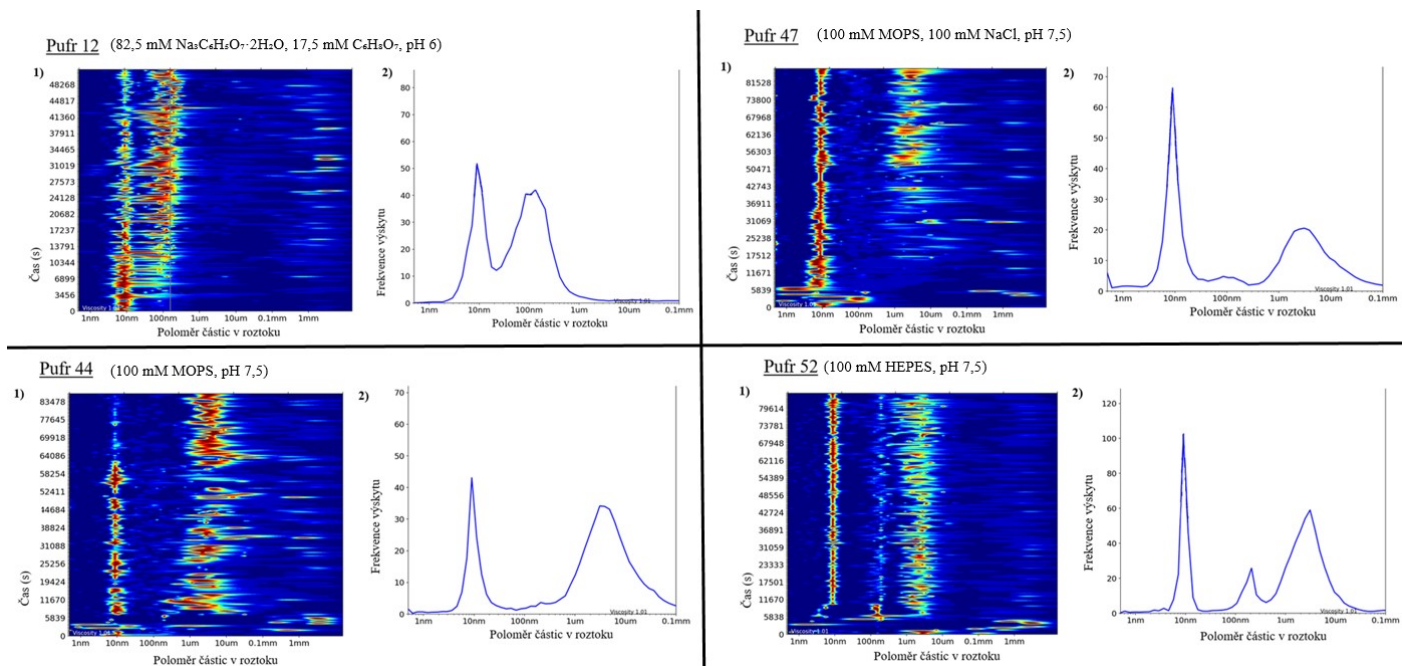
Celkem bylo analyzováno 21 pufrů, interpretovatelné výsledky se podařilo získat u 14 vzorků (stanovení u pufrů 63 a 72 nebylo úspěšné; stanovení u pufrů 16, 24, 36, 60, 69 nebylo dostatečné kvality). Výsledkem měření každých 10 minut po dobu 14 hodin je graf zobrazující změny velikosti molekul v čase (obr. 31 - 32, oddíl 1) a histogram zobrazující frekvenci výskytu jednotlivých částic o určitém poloměru (obr. 31 - 32, oddíl 2). Z naměřených dat byla vyhodnocena disperzita LmbW - testované pufr/y lze přehledně kategorizovat do dvou skupin, ve kterých se LmbW vyskytuje v následujících formách: **skupina A - monodisperzní LmbW** (reprezentováno pufr/y 28, 35, 55, 79, 83, 90, 93, 101, 106 a 114, velikosti poloměru částic 10 nm; obr. 31), celkem pět pufrů z této skupiny obsahovalo NaCl, pufr 114 obsahoval CaCl_2 a čtyři pufr/y (35, 79, 90, 101) byly bez přítomnosti NaCl, **skupina B - polydisperzní LmbW**, směs dvou či tří forem LmbW o poloměru 10 nm a 100 nm, případně 5 μm (reprezentováno pufr/y - 2 formy - 12, 44, 47 a 3 formy - pufr 52, obr. 32), celkem dva pufr/y z této

skupiny obsahovaly NaCl. Vliv přítomnosti soli na disperzitu LmbW nelze z uvedených výsledků stanovit - nebyla pozorována žádná jednoznačná korelace.

V kombinaci s výsledky z nanoDSF byly jako nejvhodnější pufr, tedy takové, které poskytují monodisperzní a stabilní protein, vybrány pufr 55 a 106. Pufr 55 byl následně testován jako alternativní purifikační pufr, nicméně již po prvním kroku purifikace (Ni-NTA) docházelo k viditelné agregaci proteinu (data nezobrazena). Pufr 106 (100mM Tris, 100mM NaCl, pH 8,0) je svým složením téměř identický k pufru, který byl původně k purifikaci proteinu LmbW použit (pufr dle Steiningerová, 2015 - 20mM Tris, 100mM NaCl, pH 8,0). Pufr dle Steiningerová, 2015 byl tedy ve všech následných experimentech používán nadále jak pro purifikace, tak jako výchozí pufr pro krystalizace (nižší koncentrace Tris neovlivňuje stabilitu LmbW a snižuje riziko interference při krystalizaci a difrakci).



Obr. 31: DLS - skupina A - monodisperzní LmbW - pufrы 28, 35, 55, 79, 83, 90, 93, 101, 106 (= vybrán na krystalizaci) a 114. Grafy (1) - osa x = poloměr částic v roztoku (nm - mm), osa y = čas (s), histogramy (2) - osa x = poloměr částic v roztoku (nm - mm), osa y = frekvence výskytu.

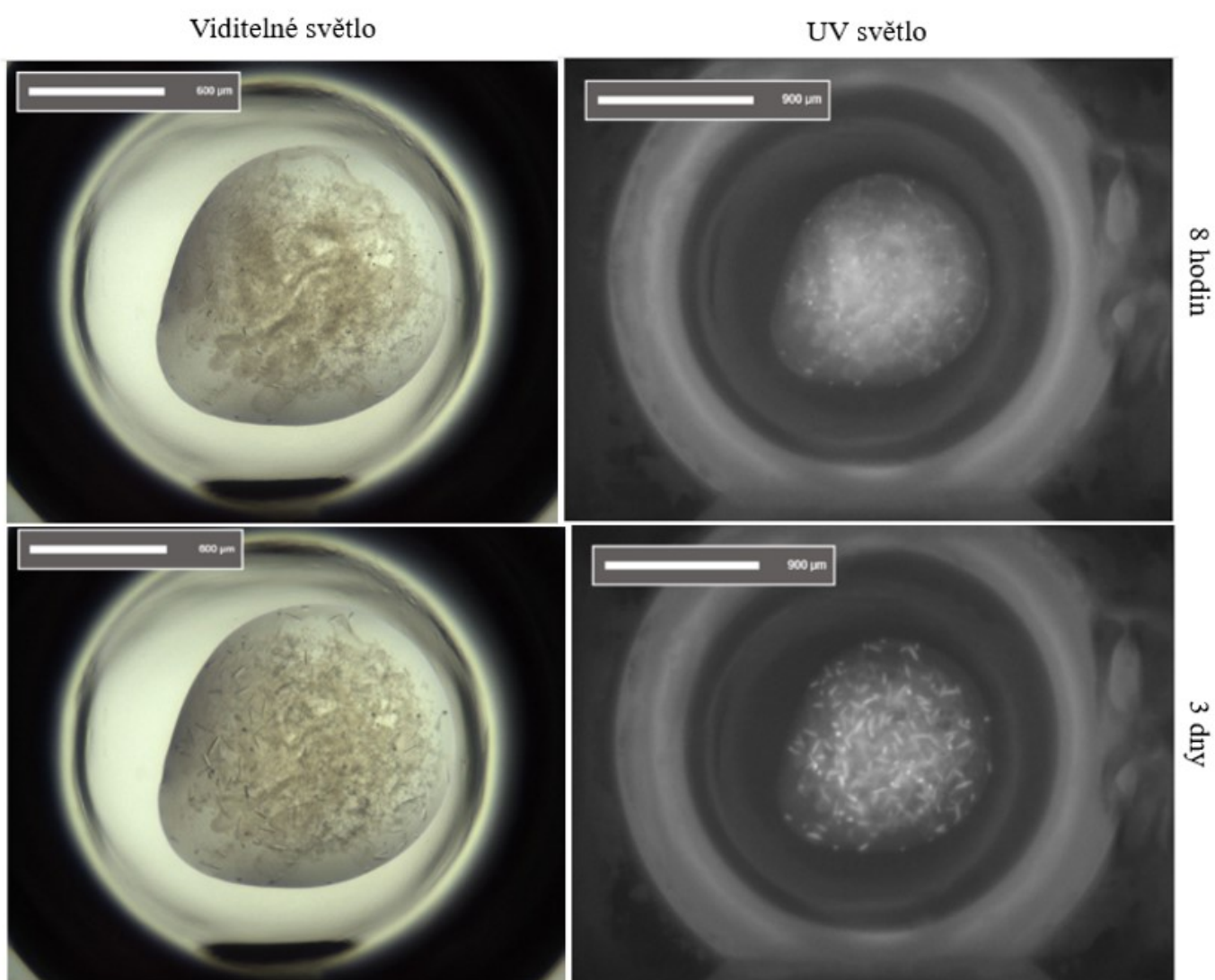


Obr. 32: DLS - **skupina B** - polydisperzní LmbW: dvě formy LmbW - pufrы 12, 44 a 47, tři formy LmbW - pufr 52. Grafy (1) - osa x = poloměr částic v roztoku (nm - mm), osa y = čas (s), histogramy (2) - osa x = poloměr částic v roztoku (nm - mm), osa y = frekvence výskytu.

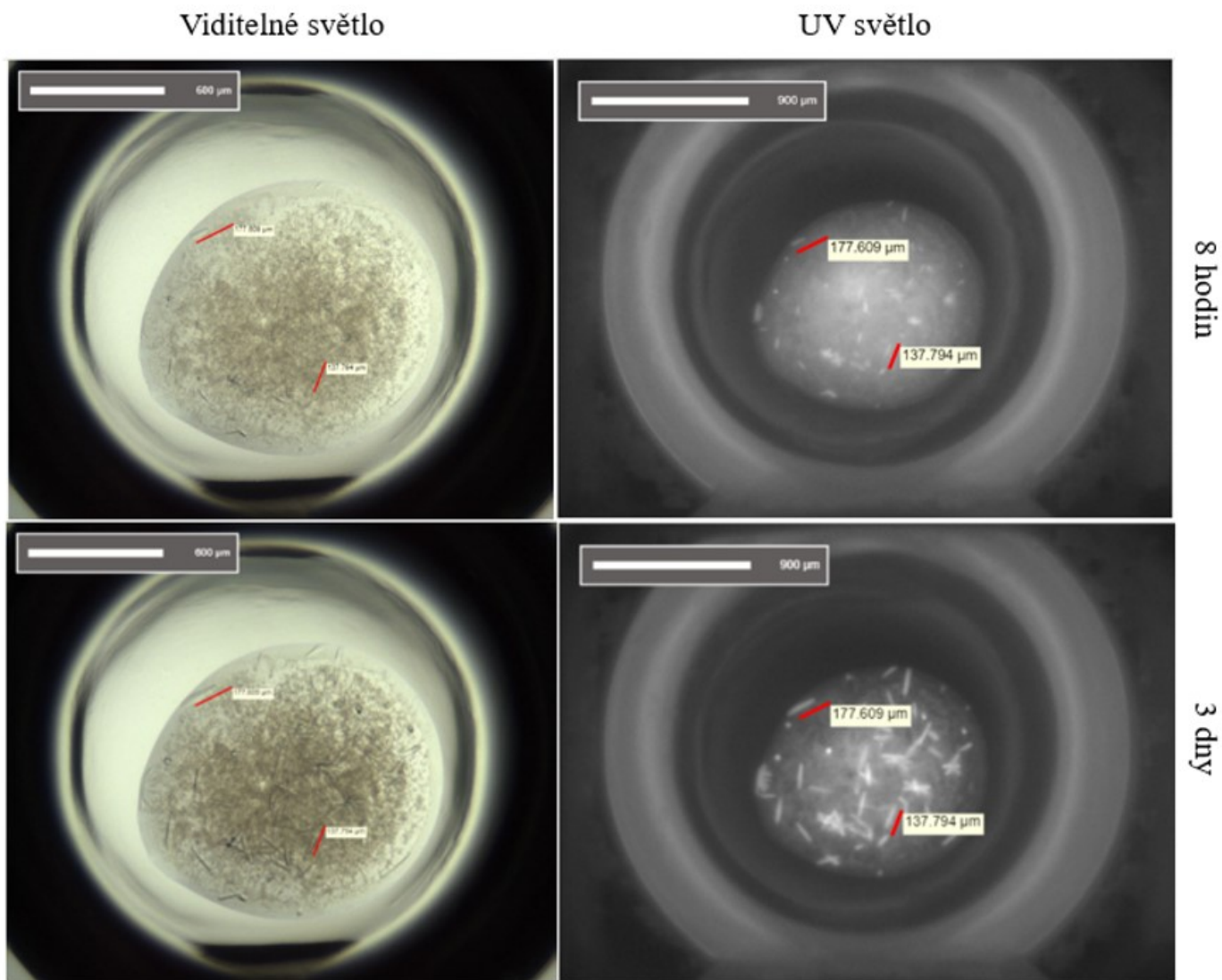
7.1.3 Krystalizace LmbW

7.1.3.1 Iniciační krystalizační screening proteinu LmbW

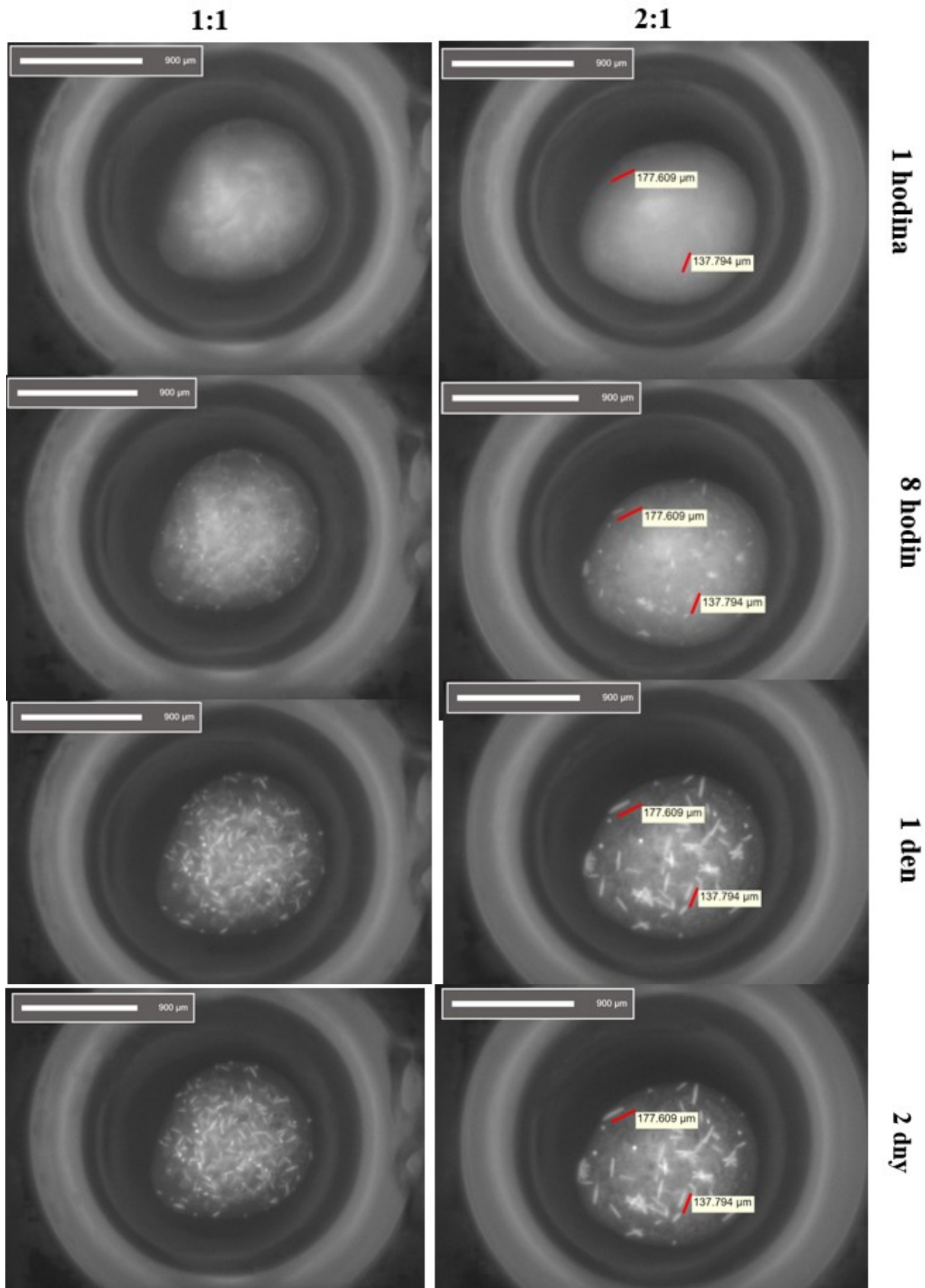
Pro iniciační krystalizaci bylo použito celkem 7 komerčních krystalizačních kitů - BCS Screen (Molecular Dimensions), JCSG+ Suite (Qiagen), Morpheus® screen (Molecular Dimensions), Morpheus® II screen (Molecular Dimensions), PACT premier™ (Molecular Dimensions), SG1™ Screen (Molecular Dimensions) a XP Screen (Jena Bioscience). Růst krystalů při použité koncentraci proteinu 16,8 mg · ml⁻¹ byl pozorován pouze v JCSG+ Suite a to v podmínce s následujícím složením: 0,17M (NH₄)₂SO₄, 15% v/v glycerol, 25,5% w/v PEG 4000. Konkrétně, krystaly jehlovitého tvaru byly zaznamenány v případě smíchání proteinu a srážecího činidla v poměru 1:1, detekováno zde bylo více drobnějších krystalů (obr. 33), u poměru 2:1 bylo v porovnání s poměrem 1:1 zaznamenáno méně krystalů, ovšem větších (obr. 34). V obou případech se první mikro-krystaly objevily již po 8 hodinách od nasazení, maximální velikosti dosáhly po 3 dnech (obr. 35). Nicméně v obou případech krystaly nedosahovaly požadované velikosti potřebné pro difrakci (potřebná velikost krystalu je ≥100 μm ve všech směrech).

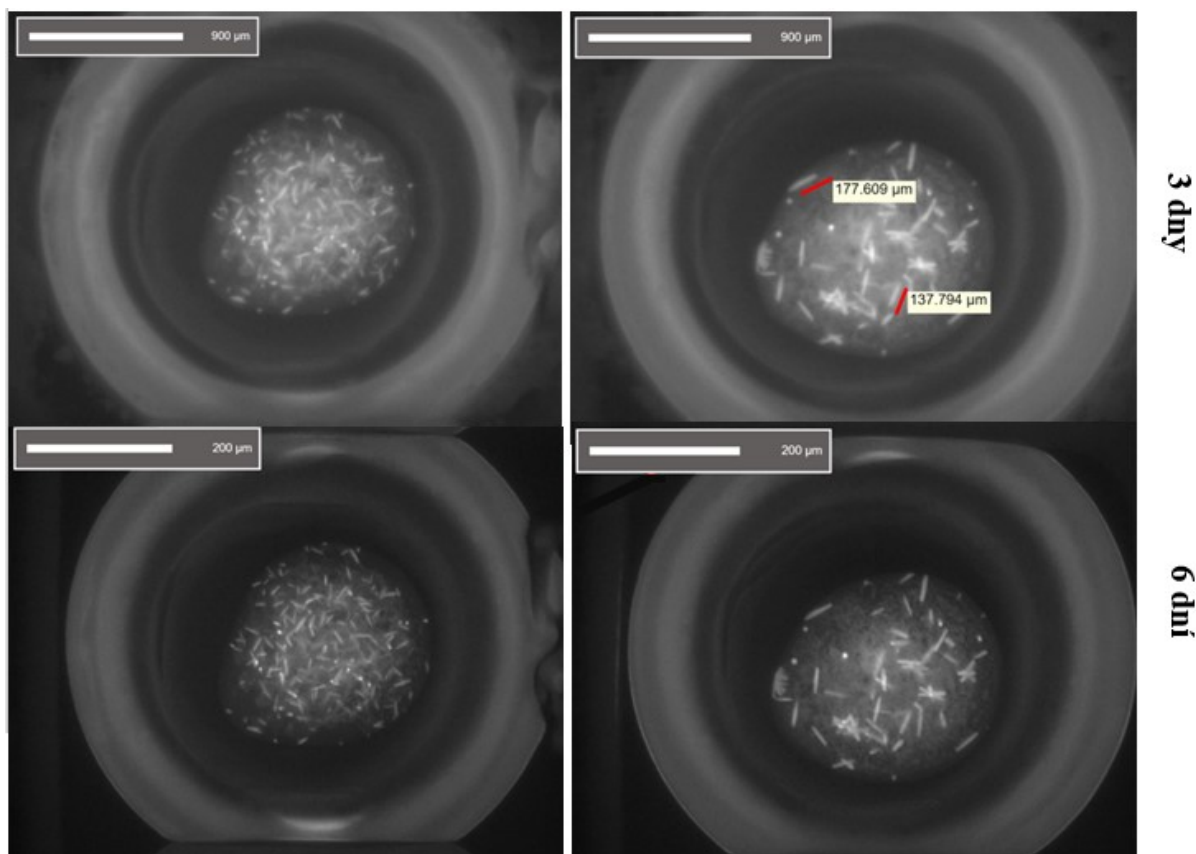


Obr. 33: Krystalizace proteinu LmbW (koncentrace $16,8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) v čase (8 hodin nahoře a 3 dny dole), poměr proteinu a srážecího činidla - 1:1, chemické složení kapky - $0,17\text{M} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15% v/v glycerol, 25,5% w/v PEG 4000. Vlevo zobrazeno viditelné světlo, vpravo UV světlo



Obr. 34: Krystalizace proteinu LmbW (koncentrace $16,8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) v čase (8 hodin nahoře a 3 dny dole), poměr proteinu a srážecího činidla - 2:1, chemické složení činidla - $0,17\text{M } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15% v/v glycerol, 25,5% w/v PEG 4000. Vlevo zobrazeno viditelné světlo, vpravo UV světlo.





Obr. 35: Porovnání růstu krystalů proteinu LmbW (koncentrace $16,8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) pod UV světlem v čase (1 hodina, 8 hodin, 1 den, 2 dny, 3 dny a 6 dní), vlevo zobrazen poměr proteinu a srážecího činidla 1:1 a vpravo poměr 2:1. Chemické složení srážecího činidla: $0,17\text{M} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15% v/v glycerol, 25,5% w/v PEG 4000. V obou případech po 3 dnech již nedošlo k dalšímu viditelnému růstu krystalů.

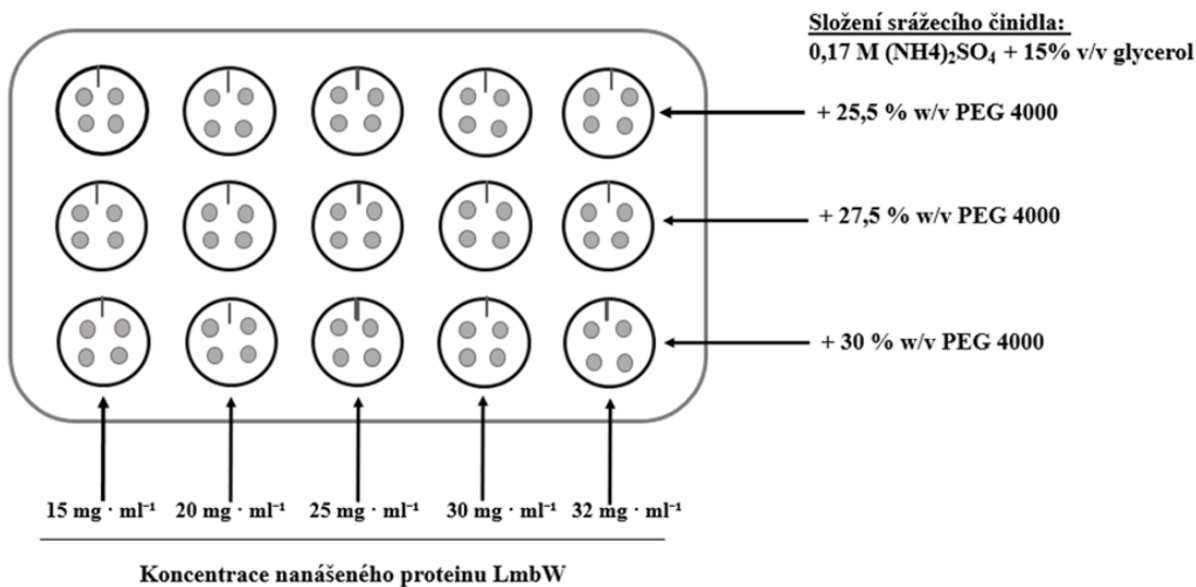
7.1.3.2 Optimalizace krystalizace proteinu LmbW

Po nalezení podmínky, která poskytla krystaly proteinu LmbW ($0,17\text{M} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15% v/v glycerol, 25,5% w/v PEG 4000), byla identická podmínka přenesena do visící kapky s cílem získat větší krystaly. Kromě přenesení do většího krystalizačního objemu a jiného fyzikálního uspořádání, které sami o sobě mají na krystalizaci velký vliv, byl zároveň testován vliv srážedla - molekuly PEG 4000, testovány byly koncentrace 25,5 %, 27,5 % a 30 % w/v a dále vliv koncentrace proteinu LmbW, testovány byly koncentrace 15, 20, 25, 30 a $32 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (obr. 36). Kromě poměru protein:srážecí činidlo 2:1, 1:1, 1:2 byl nově testován poměr 3:1 (obr. 37). Separátně byl dále také testován vliv přítomnosti kofaktoru SAM (finální koncentrace 4 mM) a předpokládaného přirozeného substrátu LmbW (látka **2**, koncentraci nelze stanovit, neboť se jedná o látku připravenou *in vitro*, k níž není dostupný standard), které byly přidány přímo k roztoku proteinu LmbW bezprostředně před nasazením.

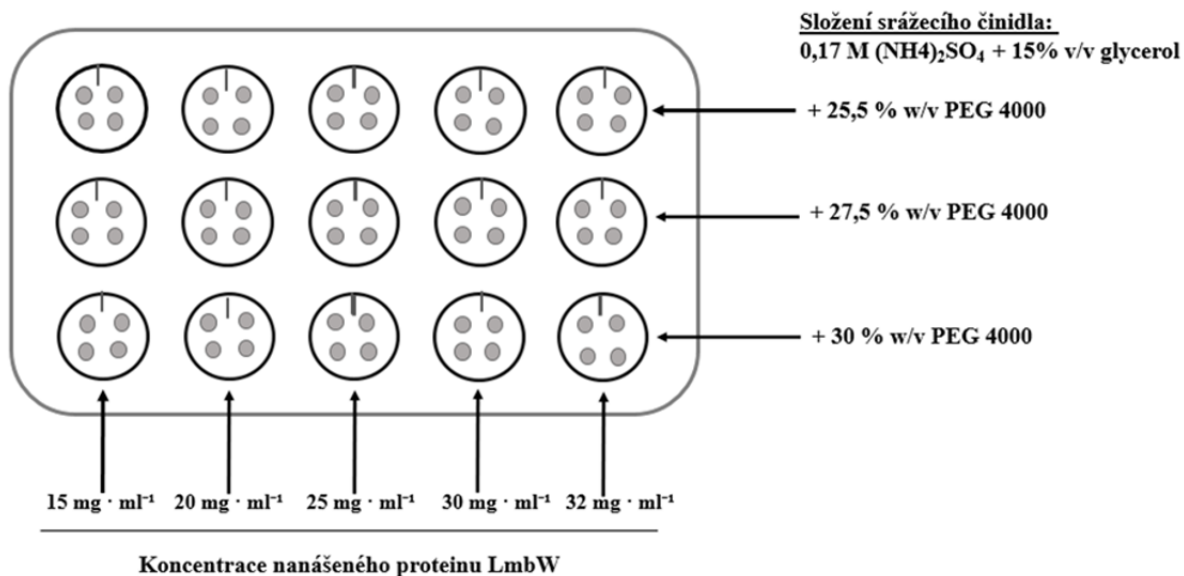
Ihned po nasazení byla pozorována agregace v kapkách (shodně v obou destičkách) obsahujících protein s koncentrací $\geq 25 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Růst krystalů byl pozorován po dobu 1 měsíce.

Nicméně, ani po 1 měsíci nebyly v žádné jamce pozorovány krystaly. Po 1 měsíci byl experiment ukončen, neboť došlo k precipitaci/vyschnutí všech kapek.

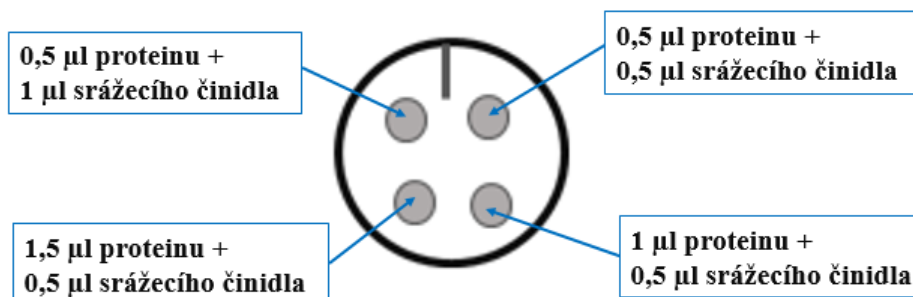
Destička 1 - pouze protein LmbW



Destička 2 - LmbW + kofaktor SAM + předpokládaný substrát (látka 2)



Obr. 36: Schéma dvou krystalizačních destiček, destička 1 - pouze protein LmbW, destička 2 - protein LmbW, kofaktor SAM a látka 2. Sloupce - koncentrační řada proteinu LmbW, řádky - koncentrační řada PEG 4000.



Obr. 37: Schéma složení jednotlivých kapek v krystalizační destičce - každá z 15 různých podmínek krystalizace LmbW obsahovala čtyři visící kapky, poměry proteinu ke srážecímu činidlu byly následující - 1:2, 1:1, 2:1 a 3:1.

7.2 Objasnění podstaty rozdílné reakční specifity Apd6 homologů - Por15 a LmbY

7.2.1 Cílená mutagenese proteinů Por15 a LmbY

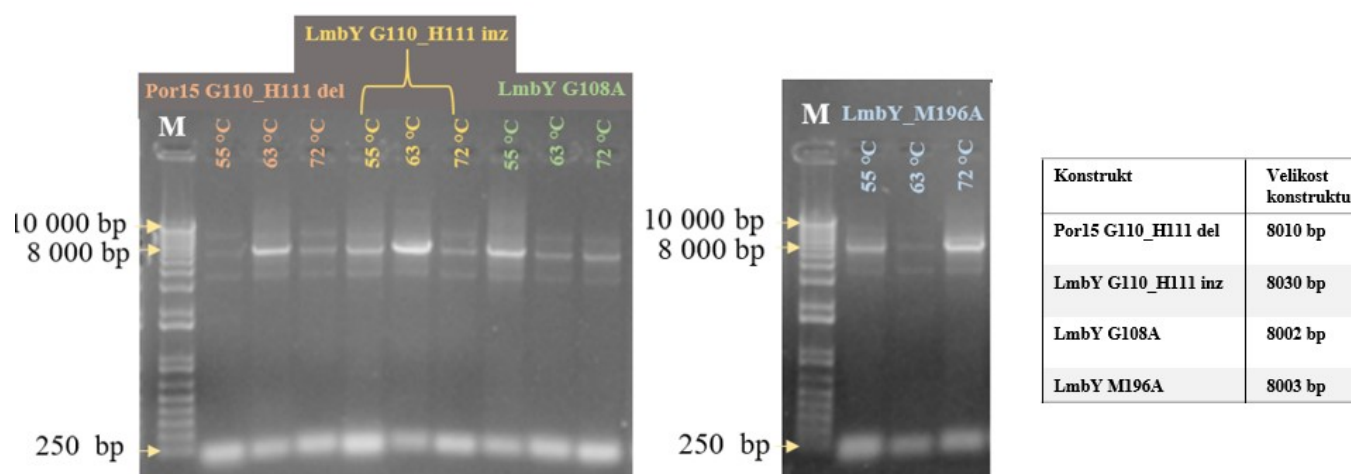
Na základě stanovených hypotéz (kap. 4.2.2.2) bylo přistoupeno k přípravě mutantů přehledně uvedených v následující tab. 10.

Tab. 10: Přehled vybraných mutací proteinů LmbY a Por15

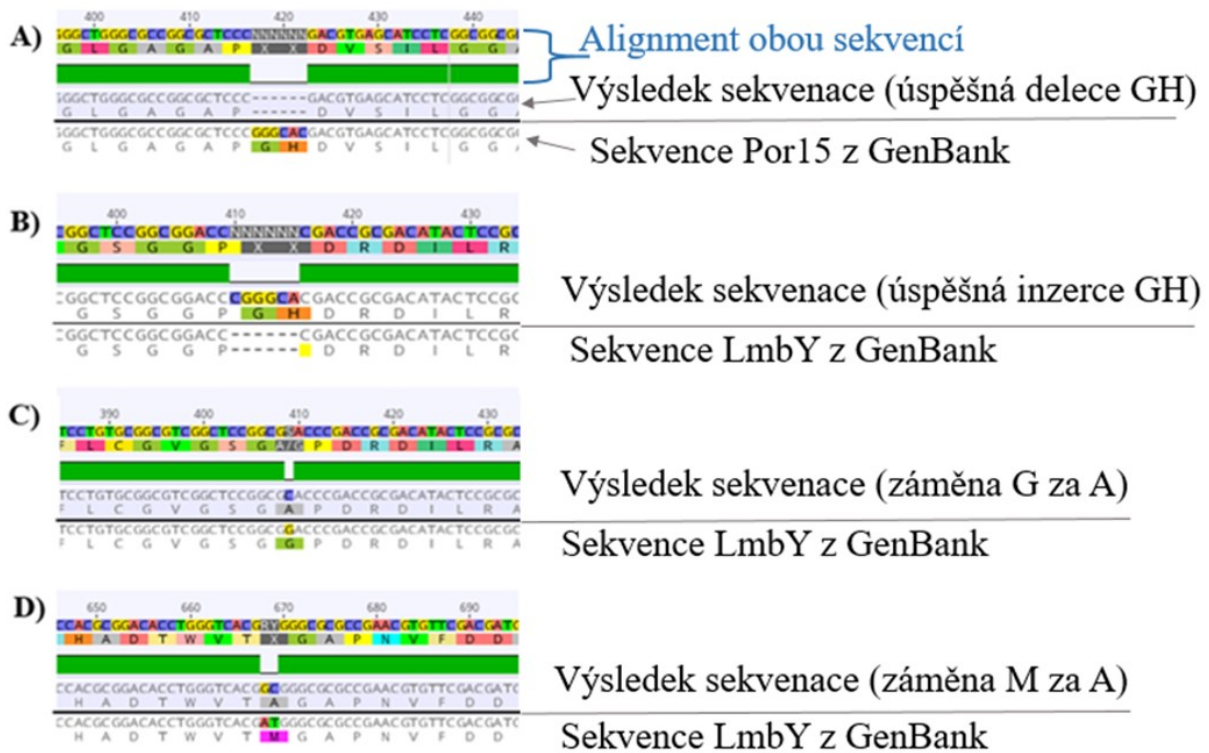
Protein a mutovaná/é aminokyselina/y	Navržená mutace	Typ mutace	Předpokládáný efekt mutace
Por15 G110, H111	G110_H111 del	Delece	Delece 2 AK - posunutí peptidového řetězce, vliv na umístění kofaktoru F ₄₂₀ vzhledem k substrátu, změna reakční specifity (na dvojnásobnou redukci)/zrušení enzymové aktivity
LmbY G110, H111	G110_H111 inz	Inzerce	Inzerce 2 AK - posunutí peptidového řetězce, vliv na umístění kofaktoru F ₄₂₀ vzhledem k substrátu, změna reakční specifity (na jednonásobnou redukci)/zrušení enzymové aktivity
LmbY G108	G108A	Záměna 1 AK	Záměna G na A - ovlivnění interakce s kofaktorem F ₄₂₀ , změna reakční specifity (na jednonásobnou redukci)/zrušení enzymové aktivity
LmbY M196	M196A	Záměna 1 AK	Záměna za menší AK - odstranění sterickeho bránění a hlubší zasunutí substrátu do aktivního místa, změna reakční specifity (na jednonásobnou redukci)/zrušení enzymové aktivity

7.2.1.1 Příprava konstruktů pro produkci mutantních variant proteinů Por15 a LmbY

Konstrukty pro produkci mutantních variant proteinů LmbY a Por15 byly připraveny pomocí PCR, v rámci optimalizace PCR cyklu byly testovány tři teploty nasedání primerů 55, 63 a 72 °C (rozmezí doporučené výrobcem použitého kitu). Dle elektroforézy DNA v agarózovém gelu (obr. 38) je patrné, že optimální teplota nasedání primerů pro mutanty Por15 G110_H111 del a LmbY G110_H111 inz je 63 °C, pro LmbY G108A 55 °C a pro LmbY M196A 72 °C. PCR produkty byly cyklizovány a byla odstraněna methylovaná DNA, transformací do *E. coli* NEB 5- α a následnou selekcí na LB agarových plotnách byly získány jednotlivé kolonie. Kultivací kolonií a následnou izolací byla získána plasmidová DNA. Sekvenací plasmidů na externím pracovišti bylo ověřeno vnesení požadovaných mutací (obr. 39).



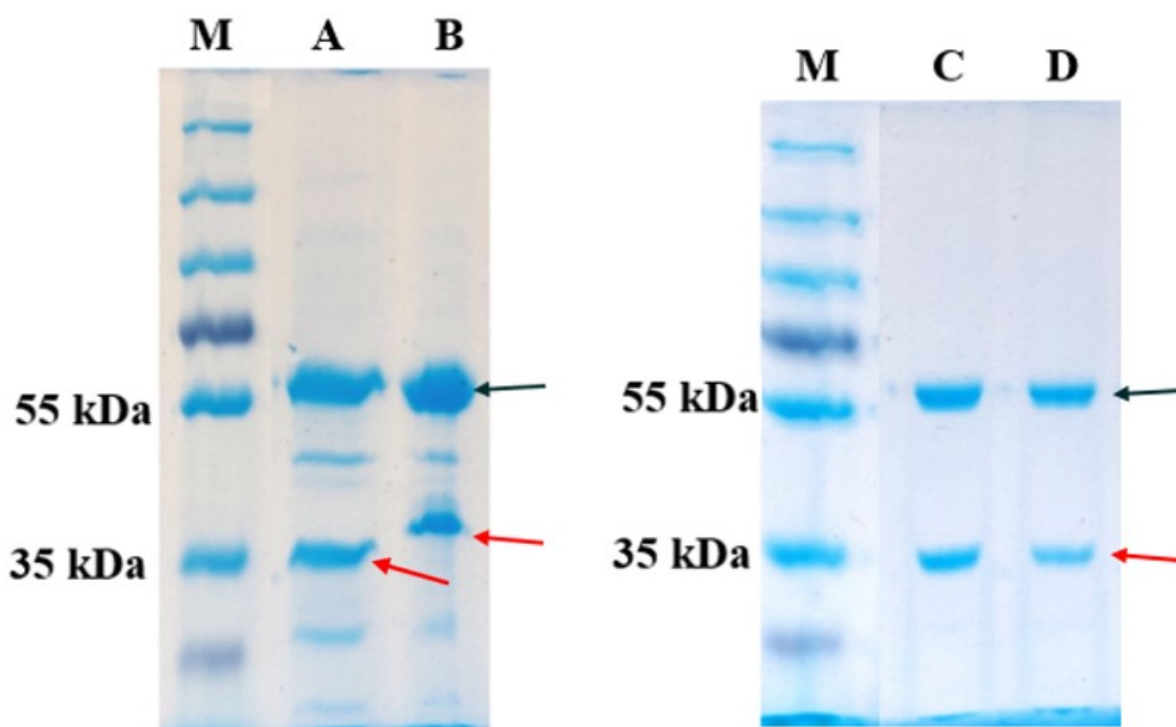
Obr. 38: Optimalizace teploty nasedání primerů při místně-specifické mutagenézi za pomoci PCR, kontrola přítomnosti lineárních PCR produktů na 1% agarózovém gelu - M = standard molekulové velikosti DNA, barevně jsou odlišeny jednotlivé mutanty, testované teploty - 55, 63 a 72 °C.



Obr. 39: Detail výsledku sekvenačních dat ověřujících vnesení požadované mutace, vyhodnoceno v programu Geneious (verze 5.5.9.). A - Por15 G110_H111 delece, B - LmbY G110_H111 inserce, C - LmbY záměna G108A, D - LmbY záměna M196A.

7.2.1.2 Produkce a purifikace mutantních proteinů LmbY a Por15

Připravené konstrukty byly použity k přípravě mutantních variant proteinů LmbY a Por15. Podmínky produkce i purifikace vycházely z publikovaných podmínek pro Apd6 poteiny (Steiningrová et al., 2020). Z 1 litru původního kultivačního objemu bylo získáno průměrně: Por GH del - 9,9 mg, LmbY GH inz - 2,1 mg, LmbY G108A - 2,2 mg, LmbY M196S - 2,0 mg. Identita purifikovaných proteinů byla ověřena pomocí SDS-PAGE elektroforézy (obr. 40).



Mutantní protein	Molekulová hmotnost (kDa)
Por G110_H111 del	33,683
LmbY G110_H111 inz	33,940
LmbY G108A	33,724
LmbY M196A	33,650

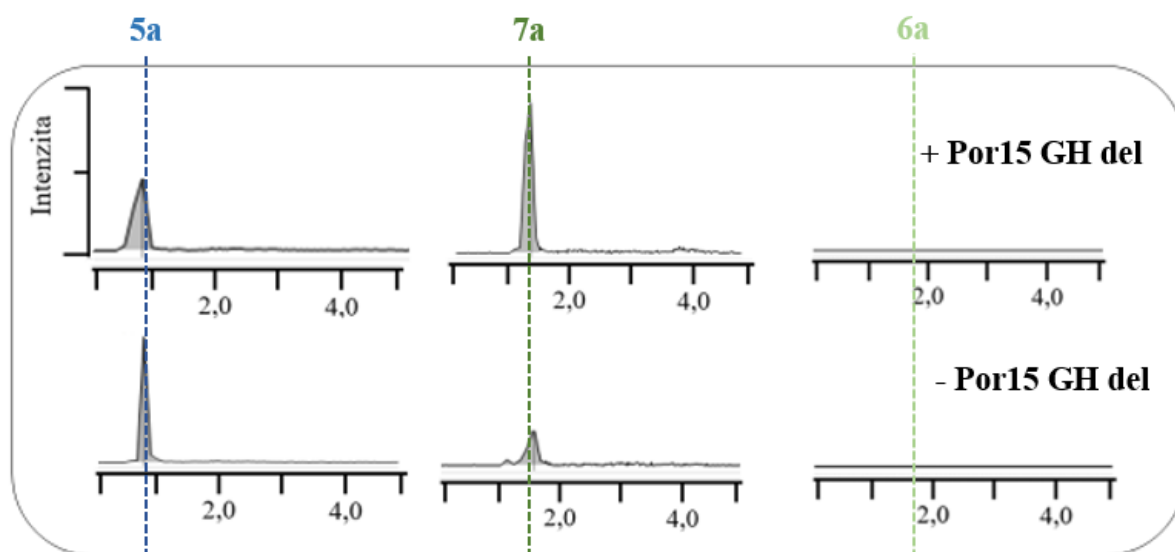
Obr. 40: SDS-PAGE elektroforéza purifikovaných mutantních proteinů po afinitní chromatografii, M = standard molekulové velikosti proteinů, A = LmbY G110_H111 inz, B = Por G110_H111 del, C = LmbY G108A, D = LmbY M196A, červenou šipkou jsou vyznačeny mutantní proteiny Por15 a LmbY, černou šipkou jsou vyznačeny chaperoniny.

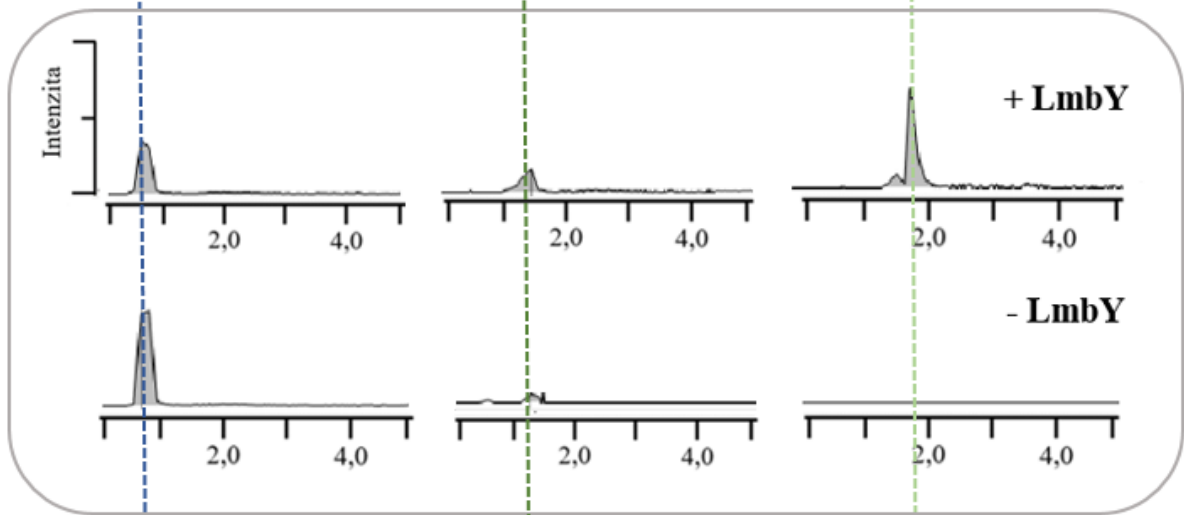
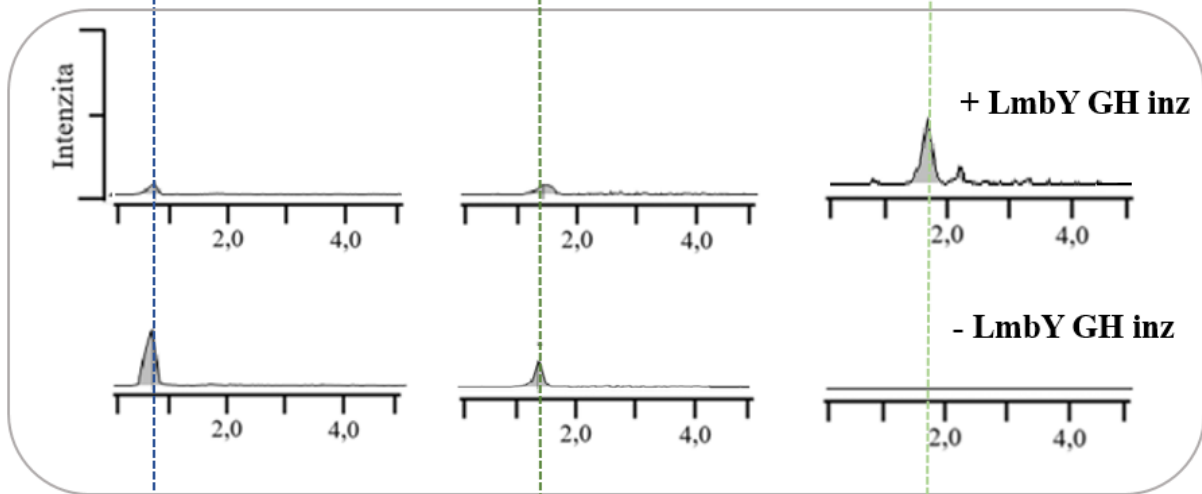
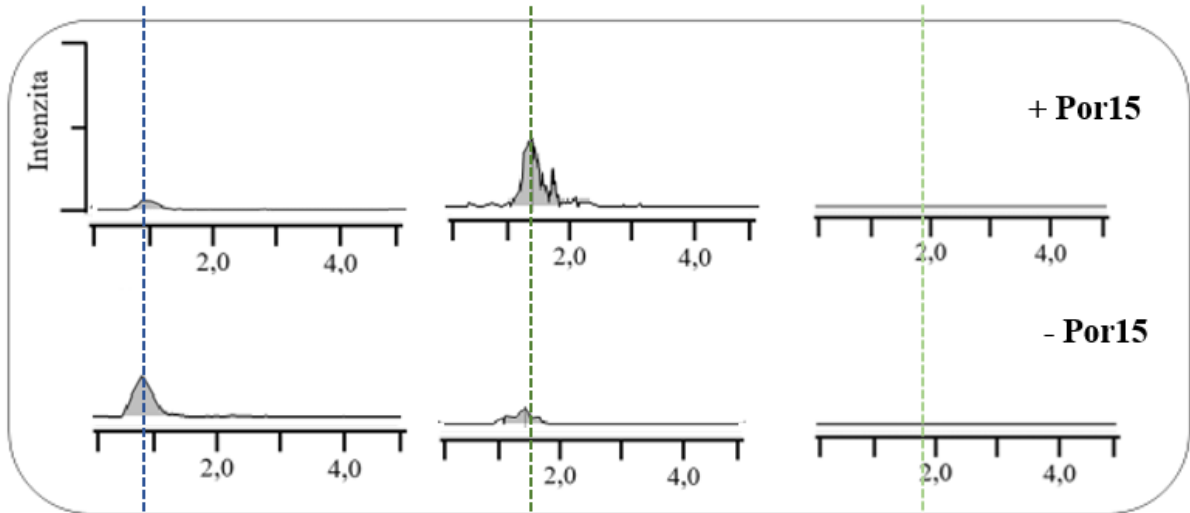
7.2.1.3 *In vitro* testování enzymatické aktivity mutantních variant proteinů

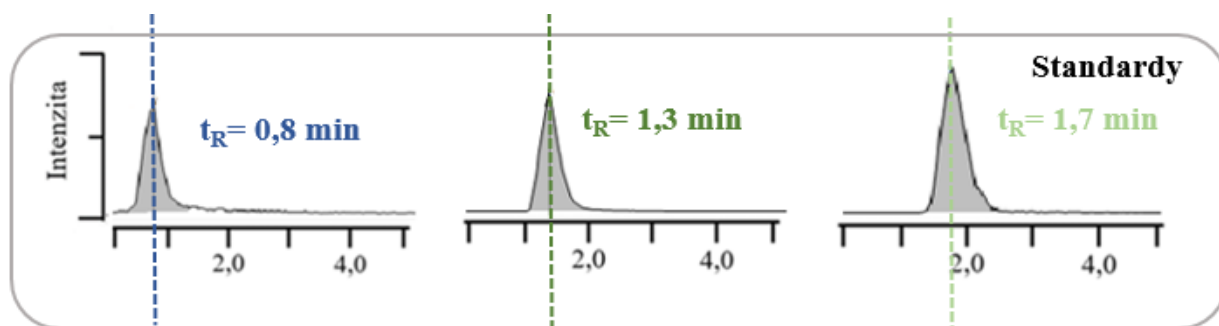
Přirozená enzymatická aktivita LmbY je přeměna substrátu - látka **5a** na plně nasycenou látku **6a**, kdežto Por15 ze stejného substrátu tvoří pouze mono-nasycený produkt - látku **7a**. Cílem mutací Por15 a LmbY bylo změnit tuto reakční specifitu, tedy aby mutanta Por15 byla schopna ze substrátu **5a** vytvořit **6a** a naopak mutanty LmbY produkt **7a**. Kromě změny reakční specifity se dále předpokládalo případné úplné zrušení enzymové aktivity jako důsledek zrušení důležité interakce s vazebnými partnery či významné narušení struktury proteinů.

Enzymatická aktivita mutantních variant proteinů Por15, LmbY byla testována *in vitro*, vznikající produkty byly monitorovány pomocí UHPLC-MS. Jako pozitivní kontroly byly připraveny reakce s nemutovanými proteiny LmbY a Por15.

Výsledky reakcí jsou zobrazeny na obr. 41 (chromatogramy pro mutanty Por15 GH del, LmbY GH inz) a obr. 42 (chromatogramy pro mutanty LmbY G108A, LmbY M196A). Chromatogramy pro mutanty LmbY G108A a M196A jsou zobrazeny odděleně (obr. 42), neboť se z technických důvodů nepodařilo experiment replikovat a data zobrazená na obr. 42 jsou tak pouze předběžnými výsledky (píky jsou nižší intenzity). Nicméně, i když se nejedná o finální data, lze i z těchto předběžných dat usuzovat vcelku jednoznačné závěry: shodně pro chromatogramy na obr. 41 i 42, reakce s mutovanými proteiny mají stejný reakční profil jako jejich nemutované formy. V porovnání s negativními kontrolami (reakce bez testovaného proteinu), došlo v reakcích s proteiny k viditelnému úbytku substrátu, který byl přeměněn na odpovídající produkty - u LmbY (pozitivní kontrola) i všech LmbY mutant byl substrát přeměněn na látku **6a**, u Por15 (pozitivní kontrola) i Por15 mutanty byl substrát přeměněn na látku **7a**.

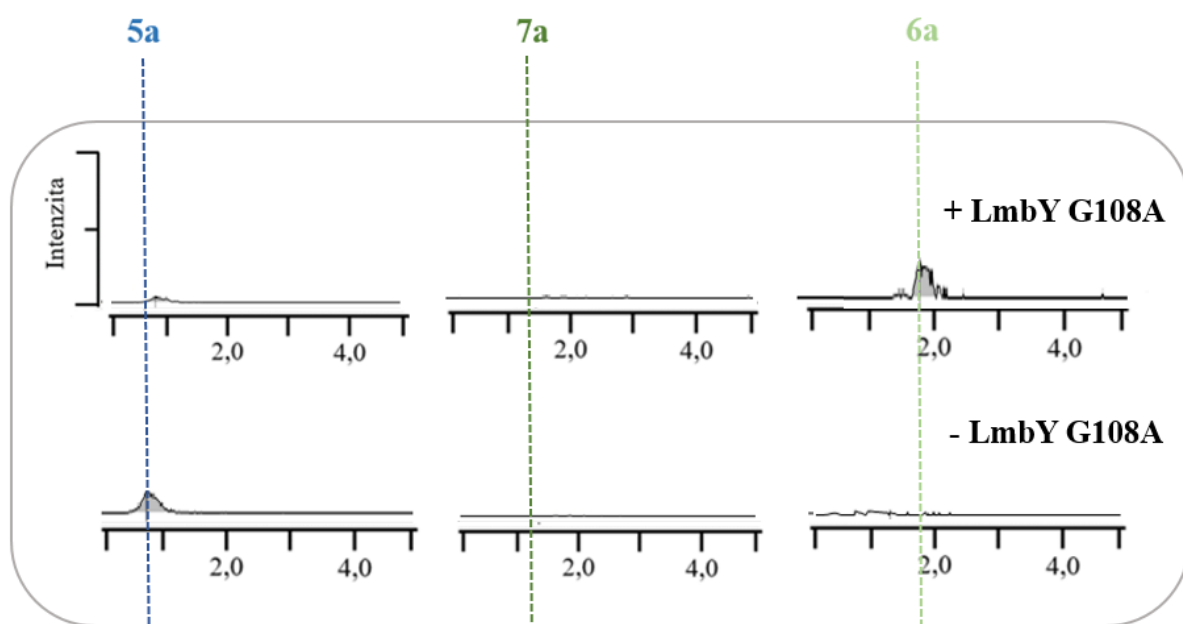


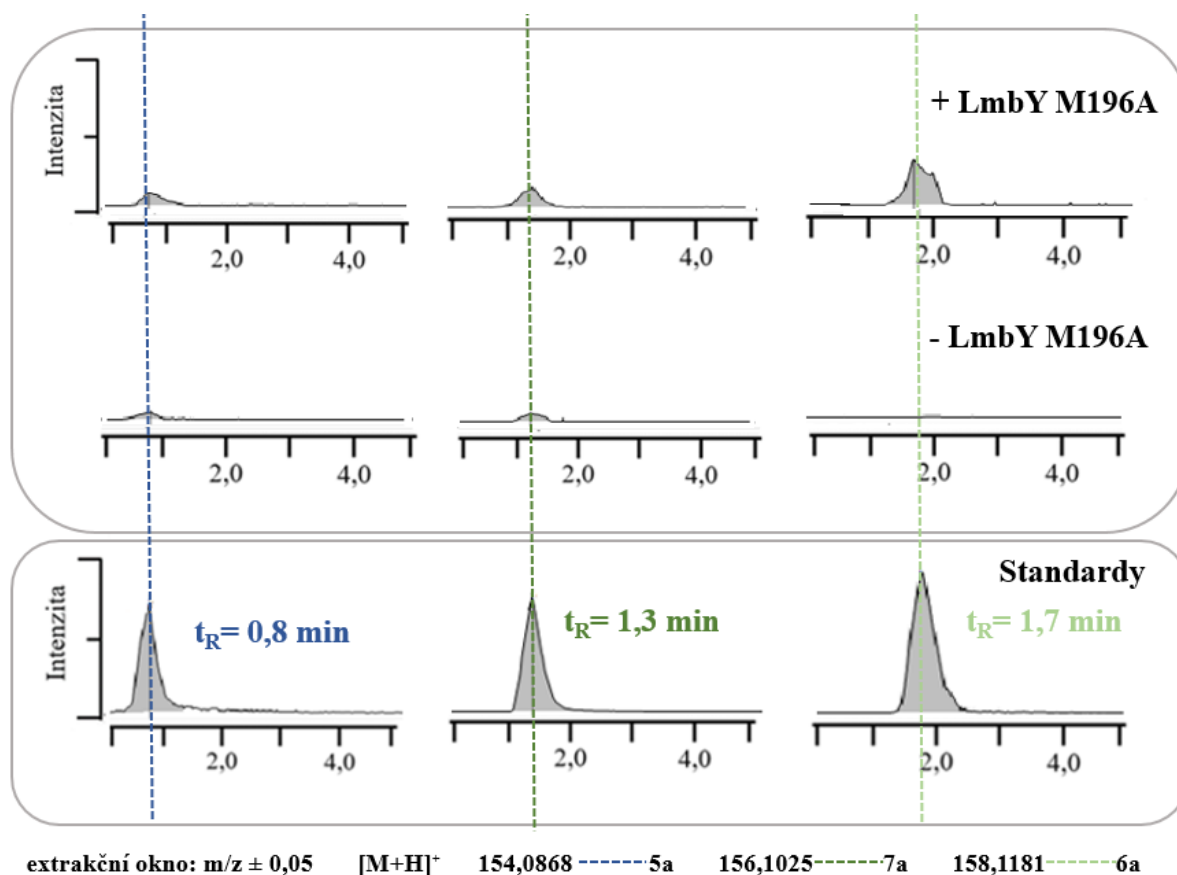




extrakční okno: $m/z \pm 0,05$ $[M+H]^+$ 154,0868 --- 5a 156,1025 --- 7a 158,1181 --- 6a

Obr. 41: UHPLC-MS analýza reakcí *in vitro* katalyzovaných mutantními proteiny - Por15 GH del, LmbY GH inz a nemutovanými LmbY a Por15. LC-MS-ion-extrahované chromatogramy zobrazují substrát **5a** (modře) a produkty **7a** (tmavě zeleně) a **6a** (světle zeleně). Substrátová specifita mutovaných proteinů LmbY a Por15 nebyla změněna - stejně jako u pozitivních kontrol (LmbY a Por15) došlo u mutantů k přeměně **5a** na **6a** (LmbY a LmbY GH inz), resp. **5a** na **7a** (Por15 a Por15 GH del).





Obr. 42: UHPLC-MS analýza reakcí *in vitro* katalyzovaných mutantními proteiny - LmbY G108A, LmbY M196A. LC-MS-ion-extrahované chromatogramy zobrazují substrát **5a** (modře) a produkty **7a** (tmavě zeleně) a **6a** (světle zeleně). Substrátová specifita mutovaných proteinů LmbY nebyla změněna - stejně jako u pozitivních kontrol (LmbY, obr. 41) došlo u mutantů k přeměně **5a** na **6a** (LmbY G108A, LmbY M196A) - zobrazené píky jsou nízké intenzity (zejména u mutace G108A) - jedná se pouze o předběžná data.

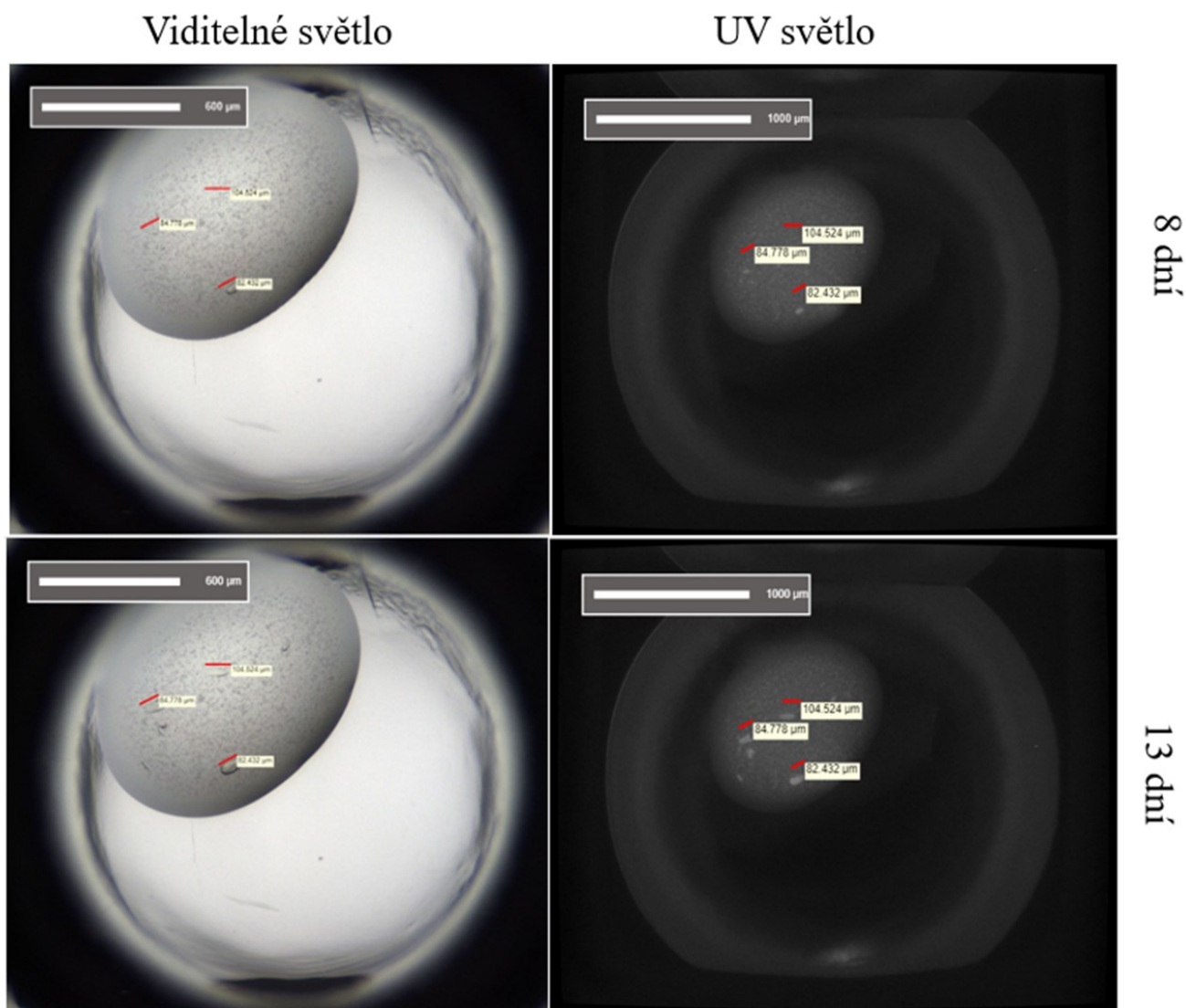
7.2.2 Příprava krystalů pro stanovení 3D struktury proteinu Por15

Vzhledem k tomu, že se mutacemi nepodařilo prokázat navrhované hypotézy, bylo dále přistoupeno ke krystalizaci homologu Por15 - cílem je získat strukturu s navázaným substrátem (látka **5a**) a kofaktorem F_{420} . Komplexní strukturální data zůstávají prozatím jediným klíčem k objasnění odlišné reakční specifity Apd6 homologních proteinů.

7.2.2.1 Interpretace krystalizace proteinu Por15

Na rozdíl od LmbW, protein Por15 již byl v minulosti krystalizován (Steiningerová, 2020a). Nicméně jednak se nikdy nepodařilo krystalizaci apoenzymu Por15 zdárně dokončit a získat potřebná difrakční data a také nebyla dosud testována krystalizace v přítomnosti substrátu a kofaktoru F₄₂₀. Na základě dat z předchozích krystalizačních experimentů byly k interpretaci a následné optimalizaci vybrány následující komerční kity: BCS Screen (Molecular Dimensions), SG1TM Screen (Molecular Dimensions) a XP Screen (Jena Bioscience), které v definovaných podmínkách poskytovaly krystaly. Protein Por15 (koncentrace 15,6 mg · ml⁻¹) byl krystalizován v přítomnosti substrátu (látka **5a**, koncentrace není stanovena, neboť se jedná o látku izolovanou z buněk a standard není k dispozici) a kofaktoru F₄₂₀ (finální koncentrace 1 mM) a to tak, že obě látky byly přidány k roztoku proteinu bezprostředně před nasazením.

Interpretací podmínek z práce Steiningerová, 2020a se sice nepodařilo získat krystaly v žádné z dříve úspěšných podmínek. Nicméně, podařilo se v destičce (obsahující substrát a kofaktor) nalézt novou podmínku, ve které byla pozorována formace krystalů. Konkrétně byly krystaly pozorovány v XP screenu: 30% v/v PEG 400, 0,1M citrát sodný, 1mM TEW a pH 5,6 v poměru 1:2 protein ke srážecímu činidlu (obr. 43). Krystaly se objevily po 8 dnech a jejich růst ustal po 16 dnech, kdy byly odebrány z destičky. Testovací difrakcí krystalů (velikosti difraktovaných krystalů v jednom směru byly následující: 82,4 μm, 84,8 μm a 104,5 μm) vzniklých v této podmínce bylo potvrzeno, že se jedná o proteinové krystaly (data nejsou zobrazena), bylo tedy přistoupeno k optimalizaci krystalizace ve visící kapce s cílem získat větší a kvalitnější krystaly.



Obr. 43: Krystalizace proteinu Por15 (koncentrace $15,6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, krystalizace probíhala i za přítomnosti kofaktoru F_{420} a substrátu Por15 - látky **5a**) v čase 8 (nahore) a 13 dní (dole). Poměr proteinu a srážecího činidla - 1:2, chemické složení činidla: 30% v/v PEG 400, 0,1M citrát sodný, 1mM TEW a pH 5,6. Vlevo zobrazen snímek pod viditelným světlem, vpravo pod UV světlem.

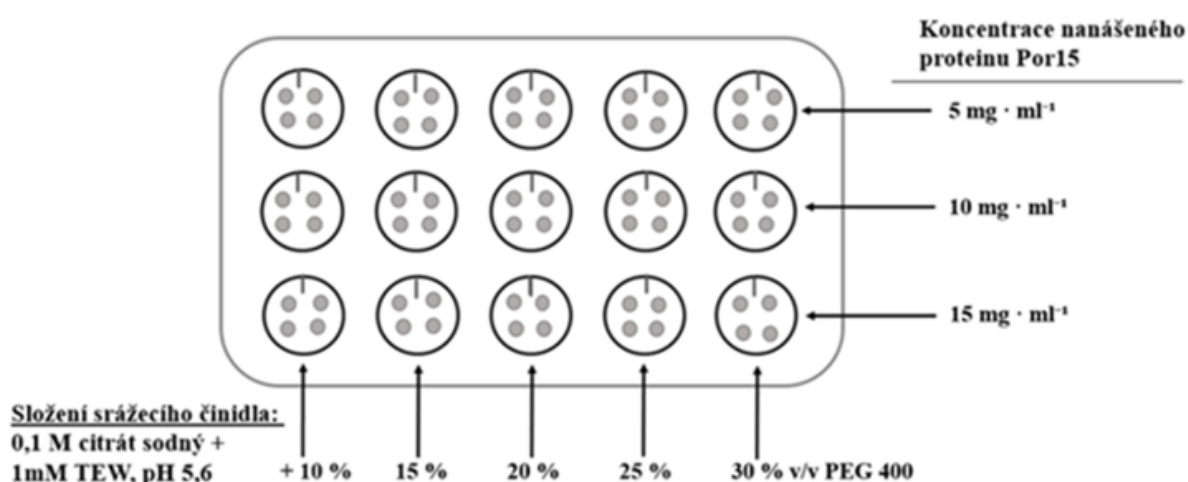
7.2.2.3 Optimalizace krystalizace proteinu Por15

Uspořádání optimalizačního experimentu je znázorněno na obr. 44, kromě přenesení do většího krystalizačního objemu a jiného fyzikálního uspořádání, byl také testován vliv koncentrace proteinu Por15 ($5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, $15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a $25 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) a dále vliv koncentrace srážedla PEG 400 (10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% a 40%). Dle původní podmínky byl přítomen substrát (látko **5a**) a kofaktor F_{420} (finální koncentrace 1 mM), které byly přidány přímo do roztoku proteinu Por15

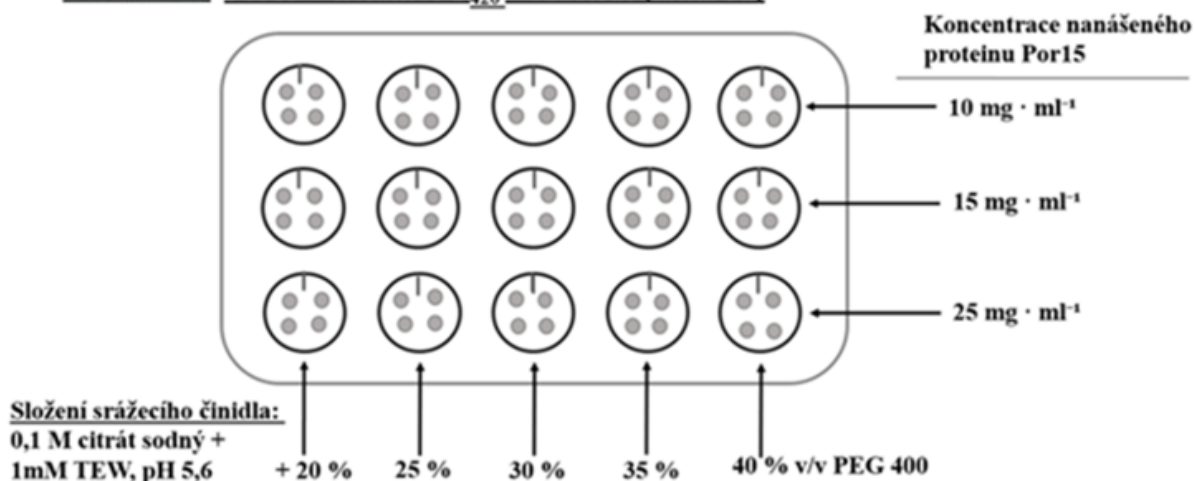
bezprostředně před nasazením. Kromě poměru protein:srážecí činidlo 2:1, 1:1, 1:2 byl nově testován také poměr 3:1 (viz. obr. 37, kap. 7.1.3.2).

Ihned po nasazení byla pozorována agregace v kapkách obsahující protein s koncentrací $\geq 15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a v kapkách obsahující vyšší koncentraci PEG 400 ($\geq 35 \%$). Růst krystalů byl pozorován po dobu 1 měsíce, nicméně během této doby v žádné jamce nebyl pozorovaný růst proteinových krystalů. Po měsíci došlo u všech kapek k precipitaci/vyschnutí, proto byl experiment ukončen.

Destička 1: Por15 + kofaktor F_{420} + substrát (látka 5a)



Destička 2: Por15 + kofaktor F_{420} + substrát (látka 5a)



Obr. 44: Schéma dvou krystalizačních destiček s proteinem Por15, substrátem (látka 5a) a kofaktorem F_{420} , destička 1 - řádky s odlišnými koncentracemi proteinu Por15 (5, 10 a 15 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), sloupce s odlišnými koncentracemi srážecího činidla - PEG 400 (10, 15, 20, 25 s 30% v/v), destička 2 - řádky s odlišnými koncentracemi proteinu Por15 (10, 15 a 25 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), sloupce s odlišnými koncentracemi srážecího činidla - PEG 400 (20, 25, 30, 35 a 40% v/v).

8. Diskuze

8.1 Determinace přirozeného substrátu LmbW za pomoci krystalografie

První část práce cílí na produkci, purifikaci a krystalizaci proteinu LmbW za účelem získání takových krystalů, jejichž difrakce poskytne data s dostatečným rozlišením pro determinaci 3D struktury jak apoenzymu LmbW, tak holoenzymu LmbW - tedy LmbW s navázaným SAM a předpokládaným substrátem (látkou 2). 3D model aktivního místa LmbW vytvořený na základě difrakčních dat je nezbytný pro determinaci přirozeného substrátu tohoto proteinu a tím pádem ke správnému zařazení LmbW do APD dráhy linkomycinu, které je bez strukturních informací stále diskutabilní.

8.1.1 Produkce a purifikace LmbW

Protein LmbW byl heterologně nadprodukován dle Steiningerová, 2015 v hostiteli *E. coli* BL21 (DE3). Následnou dvoustupňovou purifikací bylo z 1 l původního kultivačního objemu průměrně získáno 3,2 mg LmbW.

V literatuře je možné dohledat obecnou informaci, že pro krystalizaci se nejčastěji používá koncentrace proteinu v rozmezí 5 - 50 mg · ml⁻¹, přičemž vyšší koncentrace koreluje s vyšší pravděpodobností tvorby a růstu proteinových krystalů (Dessau & Modis, 2011). Čistota krystalizovaného proteinu je také důležitá a může mít vliv na tvorbu a růst krystalů, obecně se doporučuje co nejvyšší čistota (> 95 %, Dessau & Modis, 2011). Homogenita proteinu je důležitá pro samotnou tvorbu pravidelné mřížky krystalu, neboť nízká čistota nanášeného proteinu může způsobit defekty (nepravidelnosti) krystalu, který potom není vhodný na difrakční analýzu. Doplnkovým koncentračním testem bylo zjištěno, že protein LmbW lze zakoncentrovat bez viditelných agregátů až na koncentraci odpovídající 160 mg · ml⁻¹ (data nejsou zobrazena, protein v 20mM Tris-HCl, 100mM NaCl, pH 8,0). Odhadovaná čistota LmbW dle SDS-PAGE elektroforézy dosahuje požadovaných > 95 %. Dvě základní kritéria pro úspěšnou krystalizaci tak byla splněna.

8.1.2 Stabilita LmbW v různých pufrech

Aby vůbec bylo možné protein podrobit krystalizačním testům, je třeba, kromě dostatečné čistoty a kvantity, aby splňoval další základní parametr - relativní stabilitu v roztoku. I přes to, že se LmbW v použitém purifikačním pufri (20mM Tris-HCl, 100mM NaCl, pH 8,0) zdál být dle dřívějších nepublikovaných dat v roztoku stabilní (v -20 °C - týdny, v 4 °C - týdny, stanoveny v laboratoři), byl

proveden rozsáhlý stabilitní test s cílem ověřit stabilitu LmbW v purifikačním pufru a případně dále nalézt alternativu tohoto pufru (či nalézt jiný vhodný uchovávací pufr), která by proteinu poskytla ještě vyšší stabilitu. Pomocí nanoDSF byla testována stabilita v pufrech nejrůznějšího chemického složení (11 chemických skupin) pokrývajících škálu pH od 2,0 - 9,5.

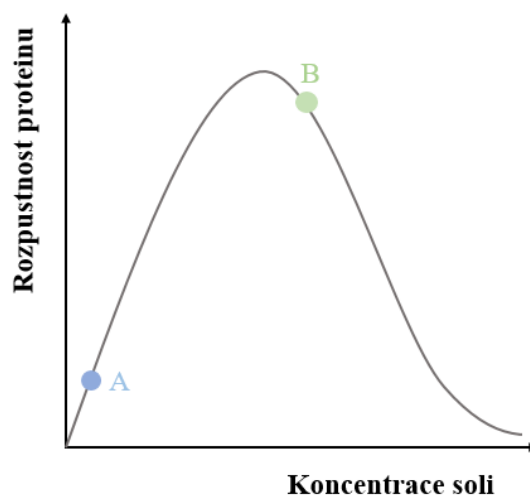
Vliv pH

Bakteriální proteiny se mohou přirozeně vyskytovat téměř v celé škále pH měřítka, nicméně většina bakterií se řadí mezi neutrofilny, ti jsou schopni žít a dělit se v prostředí, které má pH 5,5 - 9,0, ovšem uvnitř buněk je udržováno užší rozmezí pH a to 7,5 - 7,7. Toto úzké rozpětí pH také odpovídá optimu většiny cytoplazmatických proteinů (shrnuto v Krulwich et al., 2011). Na opačných koncích pH škály se nachází například proteiny extrémofilních bakterií, které jsou schopné žít a růst v prostředí s pH 1,0 - 3,0 (acidofilové) a 10,0 - 13,0 (alkalofilové). Proteiny extrémofilních bakterií jsou méně funkční či úplně ztrácí svou funkci při optimálním pH (6,5 - 7,5; shrnuto v Krulwich et al., 2011). Jako konkrétní příklad proteinu extrémních acidofilních bakterií je bakteriorhodopsin u *Halobacterium salinarum*, který plní svou funkci v pH 1,0 - 2,0 (Váró & Lanyi, 1989), naopak u alkalofilních bakterií můžeme uvést jako příklad alkalickou proteasu nacházející se například u *Bacillus sp.* AH-6 (haloalkalofilní), jejíž pH optimum je v rozmezí 8,5 - 12,0 (Dodia et al., 2008). Vliv pH na stabilitu (a aktivitu) proteinu spočívá v tom, že při nižším pH je v roztoku více vodíkových iontů (H^+), které interagují s povchem proteinu a mohou mít vliv na stabilizující vodíkové můstky, jak bylo demonstrováno například u hovězího sérového albuminu (BSA - bovine serum albumin). U BSA byl testován vliv pH na hydrofobicitu jeho povrchu (tedy destabilizaci a rozbalování), při snížení pH došlo ke zvýšení kladného náboje na povrchu BSA, naopak při vyšším pH měl povrch proteinu záporný náboj (z důvodu nižšího množství H^+ iontů v roztoku). Nejnižší hydrofobicita povrchu BSA byla naměřena při nejnižších a nejvyšších testovaných pH - 2, 3 a 11, 12 (naopak nejvyšší hydrofobicita povrchu byla naměřena při pH v rozmezí 5,0 - 7,4), při těchto krajních hodnotách došlo k narušení rovnováhy mezi hydrofobními a hydrofilními vazbami povrchu proteinu a narušení sekundárních struktur proteinu (Lan et al., 2020).

LmbW je SAM-MT nacházející se v cytoplazmě streptomycet, proto není překvapivé, že rozmezí pH, ve kterém protein LmbW dosahuje nejvyšší stability (nejvyšší T_m) je v rozmezí 6,5 - 8,5, což odpovídá hodnotám neutrálního pH uvnitř buněk a těsně kolem něj. Naopak u pufrů s nízkým pH (2,0 - 4,0), které se v buňce nevyskytuje a protein LmbW není těmito podmínkám přizpůsoben, byly pozorovány agregáty bezprostředně po přidání daného pufru k proteinu a T_m proteinu LmbW tak nebylo možné stanovit. Výsledky nanoDSF analýzy korelují i s enzymatickou aktivitou tohoto proteinu, nejvyšší aktivita byla *in vitro* pozorována v pH 9,0, nicméně protein byl plně funkční i v pH 7,5 - 8,0 - 8,5 (Steiningerová, 2015).

Vliv přítomnosti soli

Přítomnost soli (např. NaCl) v pufru ovlivňuje několik vlastností proteinu, včetně jeho stability. V přítomnosti nižší (100mM NaCl a méně) koncentrace soli (zvýšení ionizační síly pufru) dochází k vyšší rozpustnosti proteinu (obr. 45, bod A), naopak při vyšší koncentraci soli dochází ke snížení rozpustnosti proteinu (obr. 45, bod B) a jeho vyššímu srážení. Je to způsobeno tím, že kationty soli (Na^+) interagují s molekulami vody (konkrétně s kyslíkem), molekuly vody ani soli netvoří žádné interakce s proteinem, ten tedy nemá žádný hydratační obal a molekuly proteinu mají větší tendenci interagovat mezi sebou a agregovat. Nižší koncentrace soli v pufru tedy stabilizují protein za pomoci interakce iontů soli s opačně nabitými aminokyselinami proteinu (Brudar & Hribar-Lee, 2021). Z tohoto důvodu jsou tedy obecně nižší koncentrace solí běžně přidávány do purifikačních pufrů, neboť se očekává pozitivní vliv na stabilitu purifikovaných proteinů.



Obr. 45: Graf závislosti zvyšující se koncentrace soli v pufru (osa x) na rozpustnosti proteinu (osa y), při nižších koncentracích soli se rozpustnost proteinu zvyšuje (bod A), po překročení určité koncentrace soli se rozpustnost proteinu snižuje (bod B).

U proteinu LmbW nebyl prokázán jednoznačný pozitivní vliv přítomnosti soli na jeho stabilitu. LmbW v pufrách s/bez přídavku 100mM NaCl dosahoval podobných T_m , zpravidla lišících se pouze o desetiny $^{\circ}\text{C}$. Přitom u proteinů nacházejících se v cytoplazmě by se dalo spíše předpokládat, že nízká hladina NaCl jejich stabilitu bude zvyšovat, neboť NaCl (a obecně soli) jsou esenciální komponenty živých organismů. V literatuře je možné dohledat mnoho studií zabývajících se vlivem koncentrace a přítomnosti NaCl (či jiných solí) na stabilitu proteinu, jako příklad lze uvést pozitivní vliv NaCl na ribonukleasu t1 - vyšší koncentrace (1M) NaCl (také LiCl a KCl) tento protein stabilizuje (Beauchamp & Khajehpour, 2012), dále byla provedena studie zabývající se vlivem NaCl na rhodopsin, kdy v přítomnosti 4M NaCl je protein stabilní, ale při 0,5M NaCl je destabilizován (Vogel & Siebert, 2002).

Vyšší koncentrace NaCl byla také studována u γ -glutamyltranspeptidasy z *Geobacillus thermodenitrificans*, v přítomnosti 4M NaCl měla zachovanou svou enzymatickou aktivitu, nedošlo tedy k narušení sekundární ani terciální struktury (Pica et al., 2013). Stabilita proteinů a vliv přítomnosti solí se také může značně lišit, pokud se protein nachází v buňkách (*in vivo*) či se s ním pracuje mimo buňky (*in vitro*), jak bylo demonstrováno u proteinu L (povrchový protein *Peptostreptococcus magnus*). Protein L je schopný se sbalit v přítomnosti 300mM NaCl (a KCl) *in vitro*, avšak v buňkách *E. coli* i při hyperosmotických podmínkách (simulující 300mM K⁺ uvnitř buněk) je v rozbalené konformaci (Schlesinger et al., 2011).

Vliv přítomnosti redukčního činidla

Nejen přítomnost NaCl může mít vliv na stabilitu proteinu (a tím pádem i jeho krystalizaci), také další látky jako například redukční činidla mohou hrát důležitou roli. Redukční činidla zabraňují tvorbě artefaktových (nechtěných) disulfidických můstků a tím snižují riziko agregace, proto se používají jako aditiva purifikačních a krystalizačních pufrů, či jako součásti uchovávacích pufrů. Principem je navázání vodíků na cysteiny proteinu, které tak mezi sebou nejsou schopny tvořit disulfidické můstky. Z redukčních činidel jsou nejčastěji používány: 1,4-dithiothreitol (DTT), tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid (TCEP), nebo β -merkptoethanol (Levy et al., 2017; Liu et al., 2013). Konkrétním příkladem pozitivního vlivu redukčního činidla může být ukázán například na γ -glutamylcystein synthetasa - glutathion synthetase (γ GCS-GS) ze *Streptococcus agalactiae*. Při krystalizaci tohoto proteinu se bez přídavku jakéhokoli redukčního činidla podařilo získat krystal nevýznamné velikosti (délka 20 μ m), při použití činidla TCEP se podařilo získat krystal s rozměry 200 \times 200 \times 100 μ m, tedy již difraktovatelný krystal. Pozitivní vliv jiného redukčního činidla - DTT - na stejném proteinu byl ukázán i v případě uchovávání, kdy pufr obsahující DTT dokázal významně zlepšit distribuci částic (Nakashima et al., 2009).

U proteinu LmbW byl testován vliv přítomnosti redukčního činidla TCEP (2mM), nicméně podobně jako u testování vlivu přítomnosti NaCl na stabilitu proteinu, ani zde nebyla prokázána jednoznačná pozitivní korelace. LmbW ve své struktuře obsahuje osm cysteinů (z celkových 350 aminokyselin, obr. 46), lze tedy usoudit, že se artefaktové disulfidické můstky tvoří v menší míře a tudíž není třeba do pufru přidávat redukční činidlo pro zvýšení stability.

10 20 30 40
MTAVRQSPEI IELQDTEQRR GWQAF TLSQL PDMISAMHVC
 50 60 70 80
HAVHALAETP LLERLRRGPR SVDDL LAGLH EPTGTGFLRY
 90 100 110 120
LANRGVLERQ GETYLLTRLG EFLT TDSL A RLGIYVGAYG
 130 140 150 160
SVTGRMGDLL TGKATYGTDV VRDGGQLGLH CATLFSFFHT
 170 180 190 200
PVVVEAMRGR GARRVLDVGC GGGQLLVDA C LRDP SLTGIG
 210 220 230 240
LDIDPAAVEV AQDLAERQGV ADRVEFVVG D AFAPADWPEV
 250 260 270 280
CY EADGL CVM SALHEHFRHG EQAVVELLDE YAARFPHQKI
 290 300 310 320
LLVGEPELRY DGRENDDDF FLIHVLTQQGL PRDRSAWFSV
 330 340 350
FERSTLDCRR VYTRPGAGPR MCFYDLVPRR

Obr. 46: Primární sekvence LmbW, červeně vyznačeno osm cysteinů (v pozicích: 40, 151, 180, 190, 241, 248, 328 a 342).

Další faktory ovlivňující stabilitu proteinů v roztoku

Dalším poměrně důležitým faktorem ovlivňujícím stabilitu proteinů je jejich samotná koncentrace. Některé proteiny mají při vyšší koncentraci (nad 20 mg · ml⁻¹) větší tendenci mezi sebou interagovat a agregovat. Tomu, jak souvisí koncentrace proteinu s jeho vlastní stabilitou, je věnováno poměrně málo studií. Vliv koncentrace a zároveň teploty na stabilitu proteinů byl například studován na souboru proteinů: lysozym, fibrinogen, hemoglobinu A₀ a hovězí sérový albumin (BSA). Za pomoci biofyzikálních metod byla porovnávána stabilita všech čtyř zmíněných proteinů ve dvou různých koncentracích (lysozym - 10 a 350 mg · ml⁻¹, fibrinogen - 11 a 59 mg · ml⁻¹, hemoglobin - 8 a 245 mg · ml⁻¹ a BSA - 12 a 330 mg · ml⁻¹). Při nižší teplotě (10 °C) neměla koncentrace na stabilitu proteinů žádný významný vliv, při vyšší teplotě (70 - 80 °C) lysosym o vyšší koncentraci agregoval více než při nižší koncentraci, hemoglobin byl při vyšší koncentraci naopak stabilizován v porovnání s nižší koncentrací, lze tedy říci, že koncentrace proteinů v tomto případě měla na stabilitu vliv, kdežto u fibrinogenu a BSA vyšší i nižší koncentrace na agregaci (stabilitu) neměla žádný viditelný vliv (Guo et al., 2006). Vzhledem k tomu, že se již zmíněným koncentračním testem podařilo LmbW zakonzentrovat při teplotě 4 °C až k hranici 160 mg · ml⁻¹ bez zjevné agregace, lze tento protein pokládat za relativně stabilní. Další testy stability v souvislosti s koncentrací nebyly provedeny, neboť další experimentální část práce tato data nevyžadovala.

I další aditiva purifikačních/uchovávacích pufrů mohou zvyšovat stabilitu proteinů, například glycerol. Glycerol je viskózní tekutina, která má také vliv na dynamiku proteinu. Vytvořením

viskóznějšího prostředí snižuje riziko agregace proteinů díky snížení pohybu částic proteinu v roztoku, také inhibuje rozbalení proteinu díky interakci s hydrofobními částmi proteinu (při jeho sbalování či rozbalování), glycerol se váže mezi částice roztoku a proteinu (Vagenende et al., 2009). Při testování stability LmbW v pufrch metodou nanoDSF dosáhly pufrы obsahující glycerol (15%, pufrы 109 - 113) vůbec nejlepších výsledků (nejvyšší T_m) ve všech skupinách pufrů, naměřené hodnoty byly v rozmezí 44,9 - 46,9 °C. Z hlediska krystalografie je glycerol nejčastěji používaným kryosolventem, a to kvůli jeho nemrznoucím vlastnostem. Nicméně z pohledu samotné nukleace a růstu krystalů může působit jako antinukleační činidlo mechanismem podobným tomu, kterým právě zabraňuje tvorbě ledu ve směsích glycerolu a vody (Sedgwick et al.; 2007, Vera et al., 2011). Vzhledem k tomu, že ve srovnání s pufrы neobsahující glycerol se naměřené hodnoty T_m lišily pouze v jednotkách °C - tedy z pohledu stability nevýznamné hodnoty, nebyly tyto pufrы vybrány pro další testy a to z důvodu právě možné interference s následnou krystalizací. Nicméně glycerolové pufrы lze použít a jsou vhodné pro dlouhodobé skladování proteinu LmbW v -20 i -80 °C, před krystalizací je však vhodné protein převést do pufrы neobsahující glycerol.

8.1.3 Stanovení disperzity LmbW

Proteiny se mohou nacházet v několika různých formách (monomery, dimery, tetramery apod.), některá z forem činí protein více stabilní, než ostatní. Méně stabilní či z části denaturované proteiny mají větší tendenci k agregaci, také mají mnohem nižší pravděpodobnost krystalizovat. Naopak stabilní, monodisperzní protein má tendence tvořit větší krystaly bez defektů, s pravidelnou krystalovou mřížkou. Právě monodisperzita je dalším základním požadavkem úspěšné krystalizace. Jinými slovy - je potřeba, aby protein v roztoku byl zastoupen jen v jedné formě. Jak již bylo zmíněno, jedna forma umožní tvorbu pravidelné mřížky krystalu, což naopak není možné v přítomnosti několika forem, které jsou jinak velké.

V předchozí studii byl LmbW pomocí nativní proteinové elektroforézy (elektroforéza dělicí proteiny v jejich nativním stavu, nikoliv denaturované jako je tomu u SDS-PAGE) stanoven jako dimer, nicméně ve vzorku byly identifikovány i tetramerní formy (analyzovaný LmbW byl v pufrы obsahující 20mM Tris-HCl, 100mM NaCl, pH 8,0; jednostupňová purifikace - NiNTA; Steiningerová, 2015). Z tohoto důvodu bylo nutné disperzitu LmbW v různých pufrch stanovit pomocí speciální metody - DLS a na základě dat stanovit vhodný pufr, tedy nejen takový, ve kterém má LmbW poměrně vysokou hodnotu T_m , ale který zároveň poskytne výhradně monodisperzní LmbW.

Z DLS testů byly vyloučeny pufrы obsahující glycerol (jednak kvůli interferenci s DLS měřením a také kvůli již uvedené interferenci s krystalizací). Naopak byly do testu zařazeny identické pufrы s přidavkem 100mM NaCl a to přesto, že pomocí nanoDSF nebyl přímý pozitivní vliv na stabilitu

prokázán - přítomnost soli může významně ovlivňovat formu, ve které se protein v roztoku nachází (což je informace, kterou pomocí nanoDSF stanovit nelze), jak bylo například ukázáno ve studii Wowor et al., 2014, a dále pak pufr 55 (100mM HEPES, 100mM NaCl, pH 7,5) a pufr 114 (50mM HEPES, 100mM CaCl₂ a pH 7,5), pufr obdobného složení byl použit pro určení enzymatické aktivity homologu LmbW - MrsA (50mM HEPES, 100mM NaCl, pH 7,5; Braun et al., 2010) a při úspěšné krystalizaci homologu LmbW - proteinu MppJ (50mM HEPES, 100mM CaCl₂ a pH 7,5 = identické složení jako pufr 114; Zou et al., 2014).

LmbW byl celkem v 10 pufrech stanoven jako monodisperzní, shodně ve všech pufrech byla naměřena velikost částic s poloměrem 10 nm, teoreticky se všemi pufrů by bylo možné dále pracovat. Nicméně pro další práci byly vyselektovány dva pufrů: pufr 106 (složením téměř identický původnímu purifikačnímu pufru - liší se pouze koncentrací Tris - 100mM, resp. 20mM) a pufr 55 (používán pro určení enzymatické aktivity MrsA). Pufrů, ve kterých se disperzitu LmbW z technických/nejasných důvodů nepodařilo stanovit (pufr 63 a 72), nebo nebylo měření dostatečné kvality (pufrů 16, 24, 36, 60 a 69) byly vyřazeny, neboť nebylo potřeba hledat další alternativy.

8.1.4 Stanovení finálního purifikačního a krystalizačního pufru

Na základě dat z nanoDSF a DLS byl vyselektovaný pufr 55 modifikován (byla snížena koncentrace HEPES - 25mM) a bylo testováno, zda tento pufr při purifikaci neumožní ještě větší výtěžnost, než které bylo dosaženo použitím pufru obsahující Tris. Nicméně při zakoncentrování proteinu po prvním purifikačním kroku (Ni-NTA) docházelo při dosažení hranice 30 - 35 mg · ml⁻¹ k viditelné precipitaci, > 90 % proteinu v roztoku agregovalo a tento pufr byl tedy na základě tohoto experimentu vyřazen z dalšího testování. Důvod, proč se protein LmbW v daném pufru jevil na nanoDSF i na DLS stabilní zřejmě nesouvisí s koncentrací HEPES, ale s koncentrací samotného proteinu LmbW. Pro testy stability byla koncentrace LmbW řádově odlišná, než jaké koncentrace bylo dosaženo při koncentrování po prvním purifikačním kroku (1,6 mg · ml⁻¹ vs. ≥ 30 mg · ml⁻¹).

Naopak v modifikovaném pufru 106 (= původní purifikační pufr s 20mM Tris) žádné agregáty pozorovány nebyly ani při koncentračním testu (kap. 8.1.1). Pro přípravu a krystalizaci LmbW byl tedy následně používán výhradně původní purifikační pufr - 20mM Tris-HCl, 100mM NaCl, pH 8,0.

V literatuře je možné dohledat, že pro afinitní chromatografii LmbW homologních proteinů MppJ a MrsA nebyly taktéž používány pufrů obsahující HEPES, ale pufrů obsahující Tris (MrsA - 20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, pH 7,9, 5mM imidazol, 10% glycerol; MppJ - 20mM Tris-HCl, pH 8,0, 500mM NaCl, 10% glycerol, 10mM imidazol, 0,5mM fenylnmetansulfonyl fluorid). V případě MppJ následovala po Ni-NTA gelová filtrace, na kterou byl použit odlišný pufr (50 mM HEPES, pH 8). Autoři

se ovšem nezmiňují, proč použili na afinitní chromatografii a na následné experimenty pufrů odlišného složení.

8.1.5 Krystalizace LmbW

Iniciační screening - definice podmínek umožňující růst krystalů

Pro pokrytí co nejširšího spektra krystalizačních podmínek v rámci iniciačního screeningu bylo testováno celkem sedm různých komerčních krystalizačních destiček, které dohromady obsahovaly 2016 různých podmínek (každá destička obsahuje 96 různých chemických srážecích činidel, ve kterých je navíc protein nanášen ke srážecímu činidlu ve třech různých poměrech). Ve všech sedmi screenech se nachází alespoň v 50 % podmínek PEG o různé velikosti jako srážedlo, u PACT premierTMMHT-96/FX-96, BCS Screenu, Morpheus[®] screenu a Morpheus[®] II screenu se dokonce PEG nachází ve všech podmínkách destičky. U PACT premierTMMHT-96/FX-96 a Morpheus[®] II se nachází vždy jen jeden PEG v dané podmínce, u BCS Screenu můžeme nalézt podmínku obsahující směs jedenácti různých PEGů. Zbylé screeny (JCSG+ Suite, SG1TM Screen a XP Screen) mohou mít jako srážedlo PEG, ethylenglykol, glycerol, 2-propanol, 2-methyl-2-propanol, citronan sodný (Na₃C₆H₅O₇), síran lithný, imidazol, nebo neobsahují žádný precipitant. Podmínku podobnou té, ve které byly získány krystaly MppJ (50mM HEPES, 100mM CaCl₂ a pH 7,5) můžeme nalézt v XP Screenu, která obsahuje 100mM HEPES, pH 7,5, 10mM CaCl₂, 2% v/v PEG 400. Dále v tomto screenu můžeme nalézt i podmínku podobnou té použité pro testování enzymatické aktivity MrsA (50mM HEPES, 100mM NaCl, pH 7,5), jedná se o podmínku s následujícím složením: 100mM HEPES, pH 7,5, 100mM NaCl, 20% v/v mPEG 550 (PEG monomethylether). Podobné podmínky (obsahující HEPES, NaCl/CaCl₂) můžeme nalézt i u BCS Screenu a PACT premierTMMHT-96/FX-96 Screenu (pro přehlednost jsou podmínky vypsány v tab. 11 níže). Morpheus[®] obsahuje ve třetině svých podmínek (32 podmínek) HEPES výhradně ve formě *N*-2-hydroxyethylpiperazin-*N'*-2-ethansulfonan sodného a v kombinaci s 100mM MOPS. 100mM Na-HEPES, 100mM MOPS, pH 7,5 se u tohoto screenu souhrnně nazývá jako pufrací systém 2. Na-HEPES (pouze v této formě) se nachází také u SG1TM Screenu. U JCSG+ Screenu můžeme nalézt HEPES i Na-HEPES (obě formy u žádného jiného ze sedmi screenu nejsou).

Tab. 11: Srovnání podobných podmínek v krystalizačních screenech s podmínkami použitých pro stanovení enzymatické aktivity MrsA a krystalizaci MppJ (oba proteiny jsou homology LmbW).

MrsA	50mM HEPES, 100mM NaCl, pH 7,5
MppJ	50mM HEPES, 100mM CaCl ₂ a pH 7,5

Screen	Podmínka
XP	100mM HEPES, pH 7,5, 10mM CaCl ₂ , 2% v/v PEG 400
XP	100mM HEPES, pH 7,5, 100mM NaCl, 20% v/v mPEG 550
BCS	100mM HEPES, pH 7,5, 30% v/v PEG 400, 500, 600, 1000
PACT	100mM HEPES, pH 7,0, 200mM NaCl, 20% w/v PEG 6000
PACT	100mM HEPES, pH 7,0, 200mM CaCl ₂ ·2H ₂ O, 20% w/v PEG 6000
SG1 TM	100mM Na-HEPES, pH 7,5, 200mM CaCl ₂ ·2H ₂ O, 28% v/v PEG 400
SG1 TM	100mM Na-HEPES, pH 7,5, 100mM NaCl, 1,6M (NH ₄) ₂ SO ₄
SG1 TM	100mM Na-HEPES, pH 7,5, 4,3M NaCl
JCGS+	100mM HEPES, pH 7,5, 200mM NaCl, 10% v/v 2-propanol

Podmínky pro krystalizaci homologních proteinů mohou být podobné, s výhodou se často používají analogické podmínky, neboť to může zvyšovat šanci úspěšné krystalizace. V literatuře je možné dohledat, že kromě MppJ i jedna další SAM-MT byla úspěšně krystalizována v pufru obsahující HEPES (Knox et al., 2021). Proto také byly největší naděje vkládány právě do podmínek uvedených v tab. 11. Nicméně ani v jedné podmínce obsahující HEPES nebyly pozorovány krystaly. Toto pozorování může, ale také zcela nemusí, souviset se stabilitou LmbW v HEPES pufru (kap. 8.1.4), kdy vyšší koncentrace proteinu vede v tomto pufru k značné agregaci. V kombinaci s precipitanty přítomnými v daných podmínkách je agregace ještě znásobena - to ostatně bylo ve většině jamek obsahujících HEPES po krátké době po nasazení (po pár hodinách) pozorováno.

LmbW krystalizoval v podmínce obsahující 0,17M (NH₄)₂SO₄, 15% v/v glycerol, 25,5% w/v PEG 4000 a to ve dvou různých poměrech protein:srážecí činidlo - 1:1 a 2:1. Není překvapivé, že poměr 2:1 poskytl větší krystaly než 1:1, protože je zde větší množství nanášeného proteinu (0,2 μl vs. 0,15 μl).

Optimalizace - krystalizace ve visící kapce

Dalším krokem k získání difraktovatelných krystalů byla optimalizace podmínky poskytující růst krystalů LmbW. Byla zvolena strategie krystalizace ve visící kapce - oproti krystalizaci v sedící kapce je zde několik nových fyzikálních faktorů ovlivňujících nukleaci a růst krystalů. Při použití visící kapky se teoreticky dá očekávat růst větších krystalů, kvůli většímu množství nanášeného proteinu. Nicméně přenesení do jiného krystalizačního uspořádání mělo na růst krystalů negativní vliv, neboť se

nepodařilo, ani přes optimalizaci poměru protein:srážecí činidlo, koncentraci nanášeného proteinu a koncentraci srážedla, získat žádné krystaly. Důvod, proč v ani jedné z testovaných podmínek visící kapky (celkem 120 podmínek, viz. kap. 7.1.3.2) nevyrostl žádný proteinový krystal může být jednak právě změna objemu a také změna fyzikálního uspořádání, kdy změnou došlo k tak významnému narušení rovnováhy, že nedošlo k nukleaci a růstu krystalů. V literatuře je možné dohledat proteiny úspěšně krystalizované při použití obou metod (sedící i visící kapka), například fruktosy-1,6-bisfosfátu aldolasy vyizolované z *Thermus aquaticus* (Sauvé & Sygusch, 2001). Dále například oxidasa z *Thermus thermophilus* (Serrano-Posada et al., 2011), oba proteiny byly úspěšně krystalizovány při použití sedící i visící kapky, kdy při optimalizaci a použití visící kapky byly u obou proteinů získány větší krystaly. Dohledat v literatuře zdroje, kde by byla zmíněná jedna metoda krystalizace jako úspěšná a druhá jako neúspěšná je poměrně složité, protože často byla použita jen jedna z metod, nebo obě, ale obě poskytly krystaly.

Vliv přítomnosti substrátu a kofaktoru SAM na růst krystalů

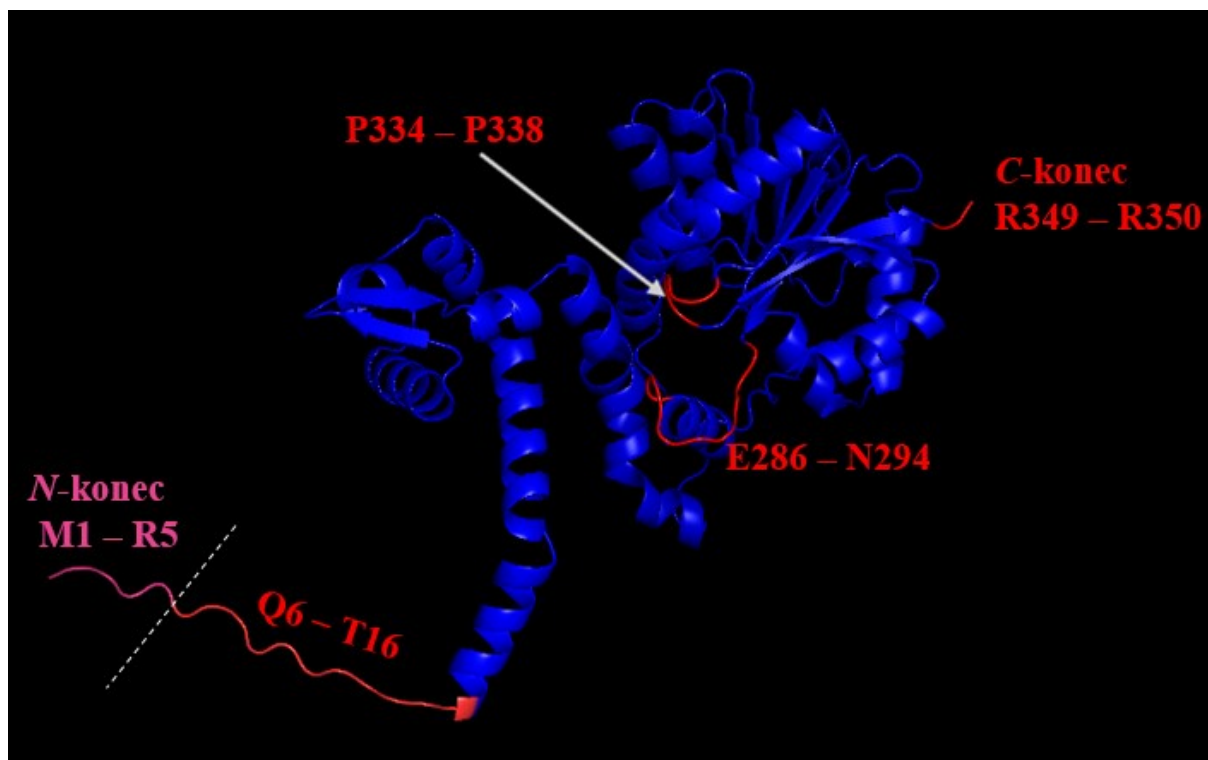
Vliv vazby substrátu a kofaktoru do vazebného místa proteinu má obecně na stabilitu a krystalizaci proteinů pozitivní vliv (shrnutí v Hassell et al., 2006). Přítomnost kofaktoru může mít i vliv na sbalování proteinu, například ferredoxin není schopný zaujmout svou nativní konformaci bez přítomnosti [2Fe-2S] center (Pagani et al., 1986). Azurin z *Pseudomonas aeruginosa* byl krystalizován v podobě apo- i holoenzymu, při porovnání obou forem je holoenzym více stabilní, při denaturaci za pomoci 3,5M guanidinium chloridu se rozbaluje 10 000 × pomaleji než jeho apoenzymová forma a sbalování v přítomnosti iontů mědi je 4000 × rychlejší než bez nich (shrnutí v Wittung-Stafshede, 2002). MppJ (homolog LmbW) byl úspěšně krystalizován v přítomnosti jeho substrátu i kofaktoru a byla vyřešena jeho 3D struktura při rozlišení 2,0 Å, zda byl MppJ krystalizován i v podobě apoenzymu autoři článku neuvádí (Zou et al., 2014).

V rámci optimalizace krystalizace ve visící kapce byl u LmbW testován vliv přítomnosti kofaktoru SAM a substrátu - látky **2**, ovšem bez výsledku - na destičce nebyly pozorovány žádné krystaly. Nicméně nelze vyvodit závěr, zda jejich přítomnost měla na stabilitu, potažmo krystalizaci LmbW vůbec nějaký vliv, neboť analogická destička bez přídavku SAM a substrátu taktéž neposkytla žádné krystaly. Důvodem je zřejmě, podobně jako u destičky bez přídavku těchto látek, příliš velká změna fyzikálních podmínek (v porovnání s krystalizací v sedící kapce) neumožňující nukleaci. Případné další experimenty by se proto měly zaměřit na testování vlivu SAM a látky **2** na krystalizaci právě v sedící kapce - tedy za identických podmínek, kdy se podařilo v rámci iniciačního screeningu získat vůbec nějaké krystaly.

Vliv His-tagu na krystalizaci LmbW

Při krystalizaci představují nestrukturované, flexibilní oblasti proteinu entropickou překážku, zejména C- a N- konce (Thornton & Sibanda, 1983), dále potom nestrukturované smyčky nebo vedlejší řetězce (Derewenda, 2010). Protein LmbW byl nadprodukován s histidinovou kotvou (His-tag) na C-konci proteinu. Některé větší značky nejen na C- a N- koncích purifikovaných proteinů mohou mít vliv na stabilitu a tedy i krystalizaci daného proteinu. His-tag je sice poměrně malá značka (1,52 kDa), ale i tak může mít (nejen) na krystalizaci zásadní vliv. Umístění His-tagu na proteinu a jeho vliv na purifikaci i krystalizaci byl například popsán u ubikvitin-přenašejícího (ubikvitin-konjugujícího) enzymu E2 - UbcA1 z *Agrocybe aegerita* (houba z rodu *Cyclocybe*). Protein UbcA1 byl nejprve nadprodukován s terminálním His-tagem na C-konci, po dvoukrokové chromatografické purifikaci byl získán poměrně vysoký výtěžek (10 mg z 1 l původní kultivace) o dostatečné čistotě (95 %), ovšem při krystalizaci byl získán sférický proteinový krystal pouze v jedné podmínce. Z tohoto důvodu byl vytvořen druhý konstrukt, který obsahoval His-tag na N-konci, po produkci a dvoukrokové purifikaci byl výtěžek i čistota srovnatelné s variantou UbcA1 mající His-tag na opačném konci. Krystalizace UbcA1 s His-tagem na N-konci po optimalizaci poskytla proteinové krystaly vhodné pro difrakci, která následně poskytla data pro determinaci 3D struktury toho proteinu při rozlišení 1,70 Å (Li et al., 2013).

Obr. 47 zobrazuje strukturní model proteinu LmbW (více o modelu v následující kap. 8.1.6), kdy barvy jednotlivých řetězců odpovídají vypočtenému B-faktoru (B-faktor udává mobilitu/flexibilitu atomu, vyšší B-faktor znamená vyšší mobilitu). Z hlediska flexibility jsou zajímavé v zásadě tři oblasti: (1) M1 - T16 představující flexibilní N-konec proteinu, přičemž vysoce flexibilní je zejména prvních pět aminokyselin (M1 - R5). Dále (2) pak oblasti E286-N294 a P334-P338 - tvořící nestrukturovanou smyčku nacházející se poblíž předpokládaného aktivního místa. (3) Poslední nestabilní část je znázorněna na C-konci, zde se však jedná pouze o krátký úsek a to terminální R349 - R350.



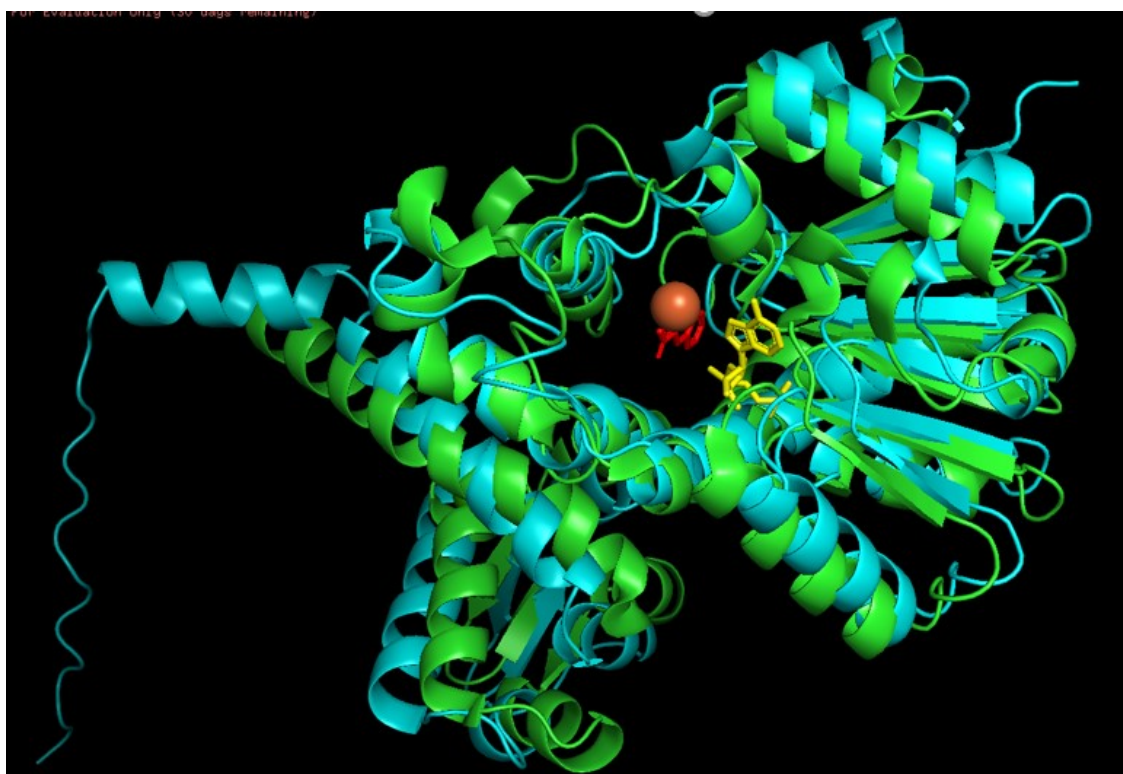
Obr. 47: Model struktury LmbW s barevně odlišenými úseky dle vypočítaného B-faktoru, znázorňující stability jednotlivých úseků proteinu (modře = stabilní, červeně a růžově = flexibilní). Nalezeny byly tři oblasti: na *N*-konci proteinu (M1 - T16), přičemž vysoce nestabilní je prvních pět aminokyselin (M1 - R5, označeno růžově). Dále pak oblasti E286 - N294 a P334 - P338. Poslední nestabilní část je znázorněna na *C*-konci (R349 - R350).

V kontextu s krystalizací homologu MppJ je podstatné z uvedených oblastí vyzdvihnout zejména právě krátký flexibilní *C*-konec. Ze struktury MppJ je patrné, že *C*-konec proteinu je součástí terminálního β -listu, který je stabilizován mnohačetnými interakcemi s antiparalelními β -listy, které ho obklopují (Zou et al., 2014). Autoři tedy vhodně zvolili umístění His-tagu právě na volný *N*-konec, kde sice bylo mnohem větší riziko interference s krystalizací - už tak flexibilní konec se ještě prodloužil (struktura MppJ na *N*-konci není vyřešena, zřejmě z důvodu, že je podobně flexibilní jako je zobrazeno v modelu LmbW - obr. 47), nicméně kdyby umístili His-tag na *C*-konec, mohl by způsobit narušení důležitých stacking interakcí mezi zmíněnými β -listy držící celou oblast pohromadě. Toto narušení by mohlo vést k destabilizaci celého proteinu a ve výsledku k obtížné krystalizaci. Vzhledem k tomu, že LmbW je pouze model, je možné, že *C*-konec je ve skutečnosti taktéž součástí posledního β -listu (a není volný, jak je v modelu zobrazeno) obklopeného (podobně jako je tomu u MppJ) dalšími dvěma antiparalelními β -listy. Autoři struktury MppJ se nezmiňují, zda jejich úspěchu předcházely neúspěšné krystalizační pokusy s MppJ mající His-tag na opačném konci proteinu. Z hlediska optimalizace

krystalizace by se následující experimenty mohly například ubírat směrem přípravy proteinu LmbW s His-tagem na *N*-konci proteinu, či přípravě proteinů s odštěpitelnou afinitní značkou. Sofistikovanějším přístupem by dále mohla být například příprava upraveného proteinu LmbW se zkráceným *N*-koncem (odstranila by se tak flexibilní část potenciálně interferující s krystalizací).

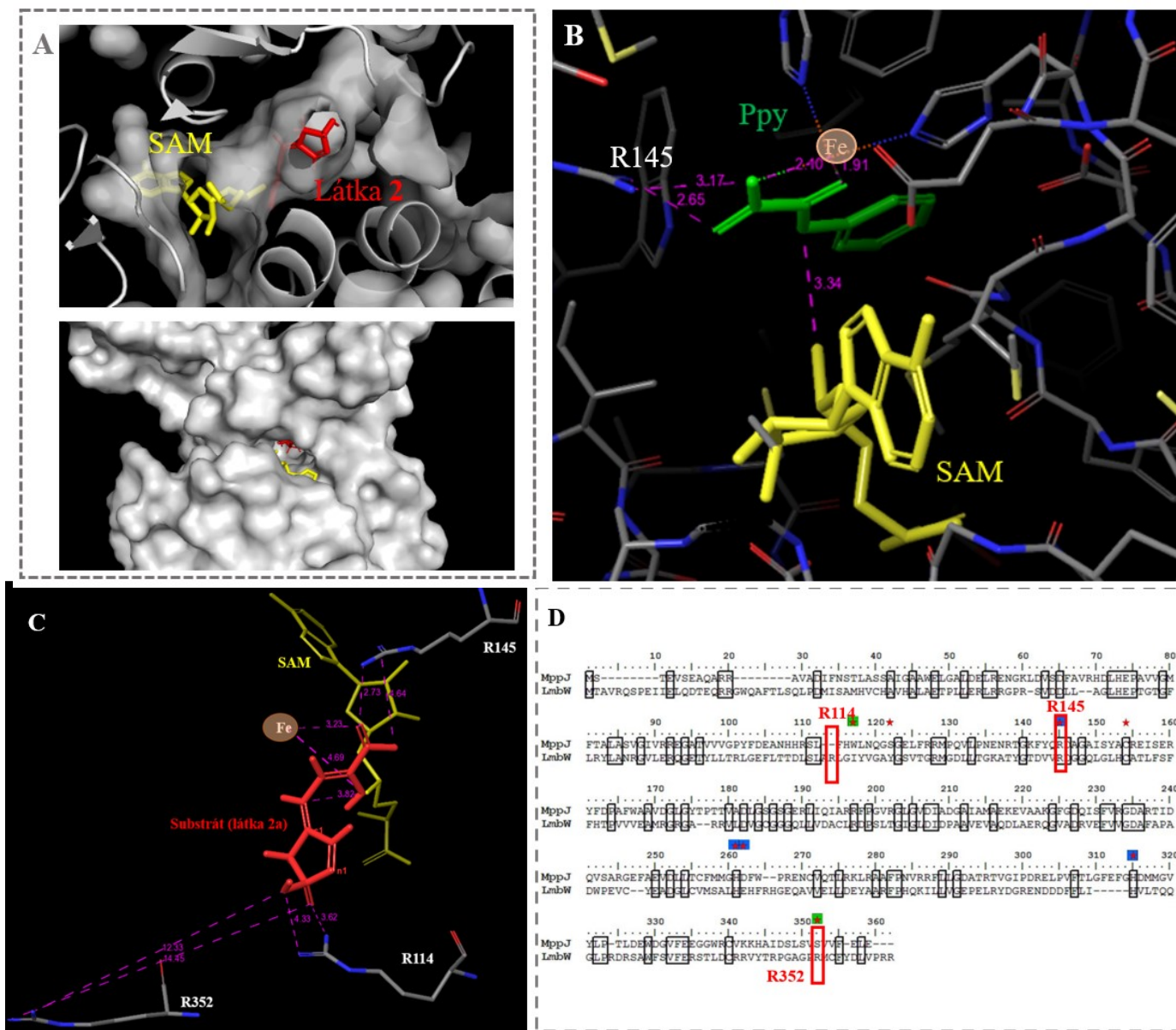
8.1.6. Model struktury LmbW - nové hypotézy

U proteinů, které zatím nemají determinovanou 3D strukturu a nedaří se dlouhodobě jejich krystalizace a následná difrakce v dostatečné kvalitě, lze s výhodou použít softwarové programy na predikci jejich 3D struktury, která často může napovědět, jak vypadá aktivní místo studovaného proteinu, jaké interakce mohou být esenciální pro vazbu substrátu/kofaktoru, či která aminokyselina je katalyticky aktivním zbytkem. Jedním z nástrojů na predikci 3D struktury proteinu je například AlphaFold (Jumper et al., 2021), téměř u všech proteinů v proteinové databázi UniProt můžeme nalézt jejich odhadovanou strukturu vytvořenou právě tímto nástrojem, včetně LmbW. Obr. 48 zobrazuje překryvný model struktury LmbW se strukturálním modelem MppJ s navázaným SAM a substrátem (fenylpyruvát, Ppy).



Obr. 48: Překryvný model MppJ (vyznačen zeleně) a LmbW (modře), žlutě vyznačen SAM, červeně vyznačen substrát MppJ - Ppy (fenylpyruvát), Fe³⁺ (oranžově).

Z překryvného modelu je patrné, že oba proteiny mají stejný strukturní fold, zařazující je do rodiny SAM-MT třídy I (motiv Rossmanova foldu, viz. kap. 3.1). Přenesením analogických interakcí kofaktoru SAM a Ppy s aminokyselinovými zbytky proteinu MppJ do struktury LmbW a nahrazení Ppy předpokládaným substrátem LmbW (látka **2**) byl získán model vazby SAM a látky **2** v předpokládaném aktivním místě LmbW (obr. 49A, C). Z modelu je patrné, že vazebné místo pro substrát je relativně prostorné (obr. 49A) - z hlediska diskuze nad skutečnou podobou substrátu LmbW (látka **2** vs látka **4b**, viz kap. 2.3.2) není tedy možné jednoznačně určit, která z uvedených látek je skutečným přirozeným substrátem LmbW, neboť uvedené látky se liší pouze délkou bočního alkylového řetězce (viz. obr. 10, kap. 2.3.2) a jak je vidět - prostor není striktně ohraničen a připouští obě varianty. V detailním pohledu na okolí vazby substrátů (Ppy, látka **2** obr. 49B, C) však lze najít důkazné interakce podporující variantu prosazovanou Kameníkem a kol., tedy že látka **2** je spíše přirozeným substrátem LmbW, než látka **4b**. Obr. 49D zobrazuje srovnání proteinových sekvencí LmbW a MppJ. Dle práce Kameník a kol. u LmbW i MppJ zbytek v pozici 145 (shodně R) interaguje s karboxylovou skupinou bočního řetězce substrátu (shodně u Ppy i látky **2**, obr. 49B, C). Co je podstatné a na základě čeho Kameník a kol. předpokládá, že látka **2** je spíše přirozeným substrátem LmbW, je interakce druhé karboxylové skupiny látky **2** (která chybí u látky **4b** i Ppy) se zbytkem v pozici 352, kterým je u LmbW taktéž R (u MppJ je v této pozici S). Z vytvořeného modelu ovšem vyplývá, že R352 je vzdálenější (12 Å, resp. 14 Å, obr. 49C), než se homologním modelováním zdálo (původní homologní model dle Kameník a kol. - obr. 12, viz. kap. 2.3.2, u obr. 12 odpovídá R352 zbytku R331 a R145 = R127). Nicméně, v pozici 114 se u LmbW taktéž nachází R (který chybí u MppJ), který je ve vhodné pozici k fixaci této druhé karboxylové skupiny látky **2** a tento nově vytvořený model tedy teorii položenou Kameníkem a kol. (s malou změnou) podporuje. Nicméně jedná se pouze opět o hypotézu, kterou bude potřeba doložit strukturními daty a případně místně-specifickou mutagenezí s následným testováním mutantních variant proteinu LmbW *in vitro*.



Obr. 49: A - aktivní místo LmbW s vyznačeným kofaktorem SAM (žlutě) a substrátem - látkou 2 (červeně), B - vzdálenost důležitých interakcí v aktivním místě MppJ, C – predikované vzdálenosti důležitých interakcí v aktivním místě LmbW, D - alignment sekvencí MppJ a LmbW, u LmbW jsou vyznačeny červeně tři důležité aminokyselinové zbytky nacházející se v aktivním místě - R114, R145 (u MppJ také R), R352 (S352 v případě MppJ; převzato a upraveno z Kameník et al., 2018, z doplňkových materiálů).

8.2 Odlišná reakční specifita Apd6 proteinů

8.2.1 Mutageneze proteinů LmbY a Por15

Na základě vyřešené struktury proteinu LmbY byly stanoveny nové hypotézy, které by mohly objasnit rozdílnou reakční specifitu Apd6 proteinů (viz kap. 4.2.2.2). Tyto hypotézy se ale v rámci této práce nepodařilo prokázat. Konkrétně byly připraveny a *in vitro* testovány čtyři mutantní varianty Apd6 proteinů: LmbY - G110_H111 inz, G108A, M196A a Por15 - G110_H111 del. Shrnutě se jednalo o dvě bodové mutace v proteinu LmbY - záměny za malou aminokyselinu alanin, a dále dvě posuvné mutace (jedna u LmbY, druhá u Por15). Očekávaný efekt mutací byl buď zrušení enzymové aktivity, či změna reakční specifity (jednonásobná vs. dvojnásobná redukce). Nicméně, všechny mutanty měly stejný reakční profil, jako jejich nemutované protějšky.

V literatuře je možné dohledat, že pro zrušení aktivity enzymu, či alespoň pro detekovatelné snížení katalytické účinnosti, někdy stačí záměna jedné aminokyseliny, jako bylo popsáno například u proteinu Rh-FGD1 (z LLHT rodiny). Konkrétně, testovány byly celkem tři jednobodové mutanty, u dvou došlo ke snížení aktivity ($4,5 \times$ a $30 \times$) a poslední mutanta ztratila svou enzymatickou aktivitu úplně (Nguyen et al., 2017). Ale existují i proteiny, u kterých měly mutace vliv na enzymovou aktivitu například až po záměně tří aminokyselinových zbytků (Li et al., 2018), dokonce existují i proteiny, u kterých ani mutací šesti aminokyselinových zbytků nebyla enzymová aktivita narušena (Heldermon et al., 2001). V souvislosti s případným snížením katalytické účinnosti nutno podotknout, že bylo v této práci pracováno s tak malým množstvím substrátu, u kterého nelze pouhé snížení konverze substrátu na produkt např. $10 \times$ detekovat (množství substrátu v *in vitro* reakci je obtížné navyšovat, neboť látka není komerčně dostupná a její příprava je náročná).

Již v minulosti byly snahy pro objasnění odlišné reakční specifity Apd6 proteinů a nalezení důležitých aminokyselinových zbytků aktivního místa úzce souvisejících s danou enzymatickou aktivitou (Steiningerová, 2020a). Konkrétně, *in vitro* byla testována enzymová aktivita 20 mutantních variant proteinů (LmbY, Por15, GriH; vytipovaných na základě homologního modelu) - z nich tři obsahovaly dvojnásobné mutace, jedna trojnásobnou a jedna čtyřnásobnou mutaci. U všech 20 mutantních variant nebyla prokázána změna či ztráta enzymatické aktivity, všechny mutanty vykazovaly stejné výsledky jako nemutované proteiny. Jak se tedy znovu potvrzuje, za rozdílnou reakční specifitou zřejmě stojí více aminokyselinových zbytků. Nelze vyvrátit, že testované aminokyseliny v rámci této práce nehrají klíčovou roli při redukci substrátu, nejspíše inserce (delece) dvou aminokyselinových zbytků a mutace jednoho zbytku není dostatečná změna v aktivním místě, která by způsobila odlišnou reakční specifitu či úplné zrušení enzymatické aktivity. Na místě je nutno připustit i skutečnost, že strukturální model apoenzymu LmbY nemusí, a zřejmě plně nereflektuje přesné pozice aminokyselin v předpokládaném aktivním místě, neboť geometrie vazebného místa může být po vazbě F₄₂₀, případně

i substrátu, pozměněna (Ahmed et al., 2016). Je tedy možné, že dokud nebude vyřešena struktura holoenzymu LmbY (či jiného Apd6 homologu), chybějící strukturní informace vůbec neumožní odhalit pravou podstatu rozdílné reakční specifity, neboť esenciální aminokyseliny hrající důležité vazebné/katalytické úlohy mohou být rozloženy prakticky v celé délce aminokyselinového řetězce (Krepkiy & Miziorko, 2004).

8.2.2 Krystalizace Por15

Na rozdíl od LmbW, protein Por15 již byl v minulosti krystalizován (Steiningerová, 2020a), proto pro „iniciační“ krystalizační screening byly vybrány pouze tři komerční krystalizační destičky, ve kterých byl za definovaných podmínek pozorován růst krystalů - BCS Screen, SG1™ Screen a XP Screen. Interpretací podmínek se ovšem nepodařilo získat krystaly za stejných podmínek jako v práci dle Steiningerová, 2020a, nicméně byla nalezena nová podmínka, ve které předtím krystaly proteinu Por15 nebyly pozorovány.

Tab. 12 ukazuje srovnání chemického složení krystalizačních pufrů a ostatní parametry krystalizace, ve kterých byl pozorován růst krystalů v této práci vs. v práci dle Steiningerová, 2020a. Jak z tabulky vyplývá, jedinými společnými znaky jsou teplota a přítomnost 1mM TEW (Anderson-Evans polyoxotungstát - $[\text{TeW}_6\text{O}_{24}]^{6-}$). TEW pomáhá při formaci krystalové mřížky proteinu za pomoci zvýšení stability přes elektrostatické interakce s proteinem (shrnuje v Bijelic & Rompel, 2017). Při dalším porovnání parametrů z tab. 12 lze předpokládat, že odlišná koncentrace nanášeného proteinu a zejména přítomnost kofaktoru F_{420} a substrátu (látka **5a**) mohla způsobit růst krystalů v nové, předtím nepopsané podmínce. Podobný případ jako je pozorován zde u Por15, tedy nejprve pozorovatelná krystalizace ve formě apoenzymu za určitých podmínek (v práci Steiningerová, 2020a) a poté (pravděpodobně) ve formě holoenzymu za zcela jiných podmínek (v této práci), byl popsán například u $F_{420}\text{H}_2$ -závislé biliverdin reduktasy z *Mycobacterium tuberculosis* Rv2074 (Biswal et al., 2006, Ahmed et al., 2016), nejedná se tedy o ojedinělou věc.

Tab. 12: Srovnání podmínek krystalizace proteinu Por15 v této studii vs. Steiningerová, 2020a.

Růst krystalů	V této práci	Steiningerová, 2020a	
Složení podmínky	30% v/v PEG 400, 0,1M citrát sodný, 1mM TEW a pH 5,6	25% v/v ethylenglykol, 1mM TEW	20% w/v PEG 3350, 0,2M NaSCN
Poměr protein:srážedlo	1:2	2:1	
Koncentrace proteinu	15,6 mg · ml ⁻¹	18 mg · ml ⁻¹	
Látka 5a , kofaktor F ₄₂₀	+	-	
Teplota	20 °C	20 °C	
Začátek růstu krystalů	Po 8 dnech	Po 12 hodinách	

Na otázku, z jakého důvodu se nepodařilo krystaly Por15 interpretovat za podmínek, které již minimálně jednou poskytly růst krystalů, neexistuje jednoznačná odpověď. Nukleace a růst krystalů u některých proteinů je proces citlivý i na velmi malé změny. To dokazuje například poněkud obskurní, ale zajímavá studie popisující vliv 26 různých zvuků na krystalizaci, vliv byl determinován matematicky a u zvuků byla měřena frekvence, amplituda, hlasitost a doba působení zvuku. Výsledkem bylo, že při působení některých zvuků byla prokazatelně zvýšena úspěšnost krystalizace v porovnání s krystalizací bez vystavení tomuto zvuku (Zhang et al., 2018). Nicméně, s problémy s interpretací krystalizace jsou nejčastěji spojené běžné věci, které jsou součástí přípravného procesu - od postupu purifikace (protein z různých purifikací), použité chemikálie, vystavení proteinu teplotním výkyvům, či odlišný postup nanášení proteinu na krystalizační destičku (např. použití jiného krystalizačního robota). Těchto faktorů je mnoho a nelze v tomto případě stanovit, jaká „změna“ způsobila to, že nebyl vypěstován žádný krystal.

Rentgenovou difrakcí bylo ověřeno, že získané krystaly jsou opravdu proteinového charakteru a nejedná se např. o krystaly soli. Po ověření byla identická podmínka přenesena k další optimalizaci do visící kapky. Identicky jako u LmbW, i zde byl paralelně testován vliv koncentrace proteinu a srážedla na krystalizaci, ale i zde nelze o vlivu jednotlivých složek spekulovat, neboť růst krystalů (stejně jako u experimentu s LmbW) nebyl pozorován ani v jedné jamce.

8.2.2.1 Krystalizace LLHT proteinů

Jedním z prvních proteinů z LLHT rodiny s determinovanou strukturou byl Adf (F₄₂₀-redukující sekundární alkoholdehydrogenasa, *Methanoculleus thermophilicus*), jeho struktura byla vyřešena při 1,80 Å a byl krystalizován v podobě holoenzymu (acetát jako substrát a kofaktor F₄₂₀). Pro krystalizaci byl použit Adf o koncentraci 12 mg · ml⁻¹, krystal rostl ve visící kapce (Aufhammer et al., 2004). Dalším

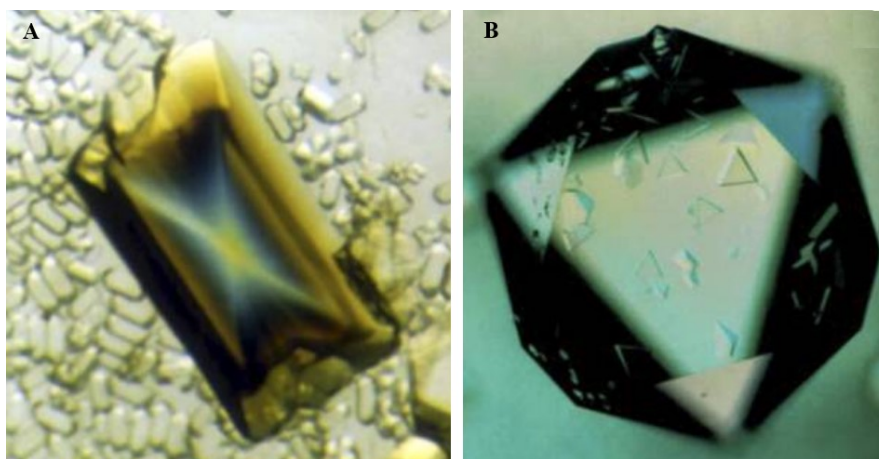
strukturně (i funkčně) anotovaným proteinem z LLHT rodiny proteinů je Mer (F_{420} -závislá methylenetetrahydromethanopterin reduktasa, *Methanosarcina barkeri*), který byl krystalizovaný s kofaktorem F_{420} i substrátem (methylen-tetrahydromethanopterin), ovšem difrakční data substrát nezobrazují. Nejspíše z toho důvodu, že substrát-vazebné místo bylo blokováno „vybouleninou“ nacházející se na kofaktoru. Struktura Mer byla vyřešena při rozlišení 2,60 Å a byl krystalizován v koncentraci $9 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, opět ve visící kapce (Aufhammer et al., 2005). Dalším úspěšně strukturně anotovaným a krystalizovaným LLHT proteinem byla například F_{420} -redukující glukosa-6-fosfát dehydrogenasa z *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb-FGD1), která byla krystalizována jak v podobě apoenzymu (rozlišení 1,90 Å), tak v podobě holoenzymu (rozlišení 1,95 Å). Jako substrát byl použit analog glukosy-6-fosfátu - 1,5-anhydro-*D*-glucitol-6-fosfát, ovšem v difraktovaném krystalu byl místo tohoto substrátu navázán citrát (pocházející ze srážecího činidla, ve kterém byl protein krystalizován). Protein byl krystalizován v sedící kapce (Bashiri et al., 2008). Dalším LLHT proteinem s vyřešenou strukturou je Rh-FGD1 (z *Rhodococcus jostii*), tento protein byl úspěšně krystalizován a difraktován jen v podobě apoenzymu (1,47 Å) za použití metody sedící kapky a koncentrace nanášeného proteinu byla $9 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Všechny pokusy získání 3D struktury Rh-FGD1 v podobě holoenzymu byly neúspěšné (autoři neuvádějí důvody), ovšem aktivní místo (i kofaktor-vazebné místo) je konzervované a při umístování kofaktoru F_{420} do 3D struktury proteinu vycházeli autoři z modelu blízkého homologu - Mtb-FGD1 (Nguyen et al., 2017).

I když autoři výše uvedených prací konkrétně nezmiňují problémy s interpretací krystalizace, neznamená to, že krystalizace byla triviální záležitostí. Značné problémy s interpretací byly například pozorovány při přípravě krystalů Apd6 homologu LmbY (krystalizace v sedící kapce, koncentrace nanášeného proteinu $11 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, rozlišení 2,40 Å - apoenzym; Zdvořáková et al. v přípravě). Náročná interpretace krystalizace Apd6 proteinů (ve formě apoenzymu) může přímo souviset i s faktem, že primární růst krystalů probíhá bez přítomnosti kofaktoru F_{420} a substrátu, což může mít značný vliv na geometrii aktivního místa krystalizovaného proteinu, jak bylo demonstrováno například u $F_{420}H_2$ -závislé biliverdin reduktasy (*Mycobacterium tuberculosis*), označované jako Rv2074. Struktura tohoto proteinu získaná krystalizací a difrakcí v podobě apoenzymu (Biswal et al., 2006) byla porovnána s nově získanou strukturou krystalizovanou v podobě holoenzymu. Obě formy Rv2074 sice vykazují stejnou topologii, ale liší se umístěním aminokyselin v aktivním místě, konkrétně kofaktor-vazebných aminokyselinových zbytků (Ahmed et al., 2016). Špatné „poskládání“ aminokyselin ve středu proteinu (kde se nachází předpokládané aktivní místo Apd6 proteinů) může teoreticky ovlivňovat složení celého proteinu do pravidelné formace, která je pro nukleaci a samotný růst krystalů esenciální. Tuto teorii podporuje i fakt, že všechny ostatní zmíněné práce pokrývající úspěšnou krystalizaci LLHT proteinů, kde byla vyřešena struktura ve formě holoenzymu, postupovaly tak, že kofaktor a substrát byly přidány k proteinu těsně před nasazením kapek do destičky. Nicméně v této práci byl v iniciačním screeningu zvolen stejný postup, kdy byl kofaktor F_{420} i substrát (látko **5a**) přidány k proteinu Por15 těsně před

nanášením. Stejný postup byl uplatněn i dále ve visících kapkách. Stejně jako u LmbW ovšem žádné krystaly nebyly získány, nejspíše také z důvodu většího krystalizačního objemu a jiného fyzikálního uspořádání krystalizace.

8.2.2.2 Krystalizace - přístupy vedoucí ke zlepšení nukleace a růstu krystalů

Strukturní biologie je stále se rozvíjející obor a i nové metody a přístupy determinace 3D struktur makromolekul jsou neustále vyvíjeny a zlepšovány. Avšak determinace 3D struktur proteinů za pomoci krystalografie je stále nejvíce využívanou metodou, struktura 90 % všech proteinů byla determinována právě rentgenovou difrakcí proteinových krystalů (Burley et al., 2021). Jednou z často používaných metod pro zlepšení nukleace a tedy zvýšení šance růstu krystalů je tzv. seeding. Při této metodě se rozdrťí již narostlé krystaly (z pravidla příliš malé krystaly na difrakci) a přidají se do krystalizačního pufru, směs se poté nanáší do jednotlivých krystalizačních kapek (shrnuto v Bergfors, 2003). Pro zlepšení růstu krystalů se také k proteinu přidávají heterologní nukleační činidla, mezi které patří například vysušené mořské řasy, koňské žíně, celulóza nebo hydroxyapatit (Thakur et al., 2007). Co je zajímavé, důležitým faktorem při růstu krystalů je také gravitace, krystalizační destičky s krystaly rostoucími za použití metody tzv. mikrogravitace jsou uloženy například na mezinárodní vesmírné stanici (shrnuto v McPherson & DeLucas, 2015). Z veřejně dostupných dat krystalizace za pomoci mikrogravitace vykazuje 90 % získaných proteinových krystalů alespoň jeden zlepšený parametr v porovnání s krystalizací na zemi, a to konkrétně velikost (obr. 50), strukturu, uniformitu, vyšší rozlišení při difrakci a/nebo mozaicitu (Wright et al., 2022).



Obr. 50: Na obrázku A i B je zobrazen jeden velký krystal tabákového virtoviru 1 (jinak nazývaným satelitní virus tabákové mozaiky), oba krystaly vyrostly v mikrogravitaci, v okolí velkého krystalu na obrázku A a na velkém krystalu na obrázku B jsou vidět mnohem menší krystaly toho samého proteinu (viru), které vyrostly na zemi po návratu z vesmíru (převzato a upraveno z McPherson & DeLucas, 2015).

9. Souhrn

- Byla optimalizována purifikace proteinu LmbW poskytující protein dostatečné kvantity a čistoty vhodné pro krystalizační studie.
- Iniciačním krystalizačním screeningem se podařilo najít podmínky poskytující růst krystalů LmbW.
- Přes veškeré úsilí se prozatím nepodařilo optimalizovat krystalizaci LmbW a získat tak krystal vhodný k rentgenové difrakci.
- Byly připraveny konstrukty pro produkci mutantních variant proteinů LmbY a Por15, mutantní proteiny byly produkovány a purifikovány.
- Enzymová aktivita mutantních proteinů byla testována *in vitro* (u dvou variant se podařilo získat jen předběžná data, nicméně i ta mají vypovídající hodnotu) - enzymová aktivita u žádné z variant nebyla dotčena, stanovené hypotézy vysvětlující rozdílnou reakční specifitu Apd6 proteinů tak nebyly potvrzeny a proto bylo dále přistoupeno ke krystalizaci Apd6 homologu Por15 v přítomnosti substrátu a kofaktoru F₄₂₀.
- Byla nalezena podmínka, při které protein Por15 tvoří v přítomnosti kofaktoru F₄₂₀ a substrátu (látka **5a**) krystaly.

10. Seznam použité literatury

- Ahmed FH, Mohamed AE, Carr PD, Lee BM, Condic-Jurkic K, O'Mara ML, Jackson CJ. Rv2074 is a novel F420 H₂ -dependent biliverdin reductase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Sci.* 2016 Sep;25(9):1692-709. doi: 10.1002/pro.2975. Epub 2016 Jul 17. PMID: 27364382; PMCID: PMC5338246.
- AMBLER RP, REES MW. Epsilon-N-Methyl-lysine in bacterial flagellar protein. *Nature.* 1959 Jul 4;184:56-7. doi: 10.1038/184056b0. PMID: 13793118.
- Andres N, Wolf H, Zähler H. Hormaomycin, a New Peptide Lactone Antibiotic Effective in Inducing Cytodifferentiation and Antibiotic Biosynthesis in Some *Streptomyces* Species. *Zeitschrift für Naturforschung C.* 1990;45(7-8): 851-855. <https://doi.org/10.1515/znc-1990-7-817>
- ARGOUDELIS AD, FOX JA, EBLE TE. U-21,669: A NEW LINCOMYCIN-RELATED ANTIBIOTIC. *Biochemistry.* 1965 Apr;4:698-703. doi: 10.1021/bi00880a014. PMID: 14323574.
- Arima K, Kosaka M, Tamura G, Imanaka H, Sakai H. Studies on tomaymycin, a new antibiotic. I. Isolation and properties of tomaymycin. *J Antibiot (Tokyo).* 1972 Aug;25(8):437-44. doi: 10.7164/antibiotics.25.437. PMID: 4648485.
- Aufhammer SW, Warkentin E, Berk H, Shima S, Thauer RK, Ermler U. Coenzyme binding in F420-dependent secondary alcohol dehydrogenase, a member of the bacterial luciferase family. *Structure.* 2004 Mar;12(3):361-70. doi: 10.1016/j.str.2004.02.010. PMID: 15016352.
- Aufhammer SW, Warkentin E, Ermler U, Hagemeyer CH, Thauer RK, Shima S. Crystal structure of methylenetetrahydromethanopterin reductase (Mer) in complex with coenzyme F420: Architecture of the F420/FMN binding site of enzymes within the nonprolyl cis-peptide containing bacterial luciferase family. *Protein Sci.* 2005 Jul;14(7):1840-9. doi: 10.1110/ps.041289805. Epub 2005 Jun 3. PMID: 15937276; PMCID: PMC2253363.
- Bair TB, Isabelle DW, Daniels L. Structures of coenzyme F(420) in *Mycobacterium* species. *Arch Microbiol.* 2001 Jul;176(1-2):37-43. doi: 10.1007/s002030100290. PMID: 11479701.
- *Barreiro EJ, Kümmerle AE, Fraga CA. The methylation effect in medicinal chemistry. *Chem Rev.* 2011 Sep 14;111(9):5215-46. doi: 10.1021/cr200060g. Epub 2011 Jun 1. PMID: 21631125.
- Bashiri G, Antony J, Jirgis ENM, Shah MV, Ney B, Copp J, Stuteley SM, Sreebhavan S, Palmer B, Middleditch M, Tokuriki N, Greening C, Scott C, Baker EN, Jackson CJ. A revised biosynthetic pathway for the cofactor F420 in prokaryotes. *Nat Commun.* 2019 Apr 5;10(1):1558. doi: 10.1038/s41467-019-09534-x. PMID: 30952857; PMCID: PMC6450877.
- Bashiri G, Squire CJ, Moreland NJ, Baker EN. Crystal structures of F420-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase FGD1 involved in the activation of the anti-tuberculosis drug candidate PA-824 reveal the basis of coenzyme and substrate binding. *J Biol Chem.* 2008 Jun 20;283(25):17531-41. doi: 10.1074/jbc.M801854200. Epub 2008 Apr 22. PMID: 18434308.
- Beauchamp DL, Khajepour M. Studying salt effects on protein stability using ribonuclease t1 as a model system. *Biophys Chem.* 2012 Feb;161:29-38. doi: 10.1016/j.bpc.2011.11.004. Epub 2011 Dec 2. PMID: 22197350.
- *Bergfors T. Seeds to crystals. *J Struct Biol.* 2003 Apr;142(1):66-76. doi: 10.1016/s1047-8477(03)00039-x. PMID: 12718920.
- Bergy, ME; Herr, RR; Mason, DJ (1963): Antibiotic lincolnensis and method of production. United States Patent: 3086912.

Bijelic A, Rompel A. Polyoxometalates: more than a phasing tool in protein crystallography. *ChemTexts*. 2018;4(3):10. doi: 10.1007/s40828-018-0064-1. Epub 2018 Aug 28. PMID: 30596006; PMCID: PMC6294228.

*Bills GF, Gloer JB. Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. *Microbiol Spectr*. 2016 Nov;4(6). doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0009-2016. PMID: 27809954.

Biswal BK, Au K, Cherney MM, Garen C, James MN. The molecular structure of Rv2074, a probable pyridoxine 5'-phosphate oxidase from *Mycobacterium tuberculosis*, at 1.6 angstroms resolution. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2006 Aug 1;62(Pt 8):735-42. doi: 10.1107/S1744309106025012. Epub 2006 Jul 24. PMID: 16880544; PMCID: PMC2242915.

Blankenfeldt W, Kuzin AP, Skarina T, Korniyenko Y, Tong L, Bayer P, Janning P, Thomashow LS, Mavrodi DV. Structure and function of the phenazine biosynthetic protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 23;101(47):16431-6. doi: 10.1073/pnas.0407371101. Epub 2004 Nov 15. PMID: 15545603; PMCID: PMC534541.

Braun SD, Hofmann J, Wensing A, Ullrich MS, Weingart H, Völksch B, Spiteller D. Identification of the biosynthetic gene cluster for 3-methylarginine, a toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93. *Appl Environ Microbiol*. 2010 Apr;76(8):2500-8. doi: 10.1128/AEM.00666-09. Epub 2010 Feb 26. PMID: 20190091; PMCID: PMC2849186.

Brazhnikova MG, Konstantinova NV, Mesentsev AS. Sibiromycin: isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)*. 1972 Nov;25(11):668-73. doi: 10.7164/antibiotics.25.668. PMID: 4647835.

Brudar S, Hribar-Lee B. Effect of Buffer on Protein Stability in Aqueous Solutions: A Simple Protein Aggregation Model. *J Phys Chem B*. 2021 Mar 18;125(10):2504-2512. doi: 10.1021/acs.jpcc.0c10339. Epub 2021 Mar 3. PMID: 33656887; PMCID: PMC8041305.

Burley SK, Bhikadiya C, Bi C, Bittrich S, Chen L, Crichlow GV, Christie CH, Dalenberg K, Di Costanzo L, Duarte JM, Dutta S, Feng Z, Ganesan S, Goodsell DS, Ghosh S, Green RK, Guranović V, Guzenko D, Hudson BP, Lawson CL, Liang Y, Lowe R, Namkoong H, Peisach E, Persikova I, Randle C, Rose A, Rose Y, Sali A, Segura J, Sekharan M, Shao C, Tao YP, Voigt M, Westbrook JD, Young JY, Zardecki C, Zhuravleva M. RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jan 8;49(D1):D437-D451. doi: 10.1093/nar/gkaa1038. PMID: 33211854; PMCID: PMC7779003.

*Castellano I, Merlino A. γ -Glutamyltranspeptidases: sequence, structure, biochemical properties, and biotechnological applications. *Cell Mol Life Sci*. 2012 Oct;69(20):3381-94. doi: 10.1007/s00018-012-0988-3. Epub 2012 Apr 21. PMID: 22527720.

*Cavalier-Smith T. Origins of secondary metabolism. *Ciba Found Symp*. 1992;171:64-80; discussion 80-7. doi: 10.1002/9780470514344.ch5. PMID: 1302186.

Ciegler A, Lillehoj EB, Peterson RE, Hall HH. Microbial detoxification of aflatoxin. *Appl Microbiol*. 1966 Nov;14(6):934-9. doi: 10.1128/am.14.6.934-939.1966. PMID: 16349699; PMCID: PMC1058446.

Colabroy KL, Hackett WT, Markham AJ, Rosenberg J, Cohen DE, Jacobson A. Biochemical characterization of L-DOPA 2,3-dioxygenase, a single-domain type I extradiol dioxygenase from lincomycin biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*. 2008 Nov 15;479(2):131-8. doi: 10.1016/j.abb.2008.08.022. Epub 2008 Sep 17. PMID: 18817745.

Connor KL, Colabroy KL, Gerratana B. A heme peroxidase with a functional role as an L-tyrosine hydroxylase in the biosynthesis of anthramycin. *Biochemistry*. 2011 Oct 18;50(41):8926-36. doi: 10.1021/bi201148a. Epub 2011 Sep 23. PMID: 21919439; PMCID: PMC3196660.

Daniels L, Bakhiet N, Harmon K. Widespread Distribution of a 5-Deazaflavin Cofactor in Actinomyces and Related Bacteria. *Syst Appl Microbiol*. 1985;6(1):12-17. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(85\)80004-7](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(85)80004-7).

Derewenda ZS. Application of protein engineering to enhance crystallizability and improve crystal properties. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010 May;66(Pt 5):604-15. doi: 10.1107/S090744491000644X. Epub 2010 Apr 21. PMID: 20445236; PMCID: PMC3089013.

Dessau MA, Modis Y. Protein crystallization for X-ray crystallography. *J Vis Exp*. 2011 Jan 16;(47):2285. doi: 10.3791/2285. PMID: 21304455; PMCID: PMC3182643.

Dodia MS, Bhimani HG, Rawal CM, Joshi RH, Singh SP. Salt dependent resistance against chemical denaturation of alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. *Bioresour Technol*. 2008 Sep;99(14):6223-7. doi: 10.1016/j.biortech.2007.12.020. Epub 2008 Jan 22. PMID: 18215518.

Ebert S, Fischer P, Knackmuss HJ. Converging catabolism of 2,4,6-trinitrophenol (picric acid) and 2,4-dinitrophenol by *Nocardioides simplex* FJ2-1A. *Biodegradation*. 2001;12(5):367-76. doi: 10.1023/a:1014447700775. PMID: 11995829.

Farmer JD Jr, Gustafson GR, Conti A, Zimmt MB, Suggs JW. DNA binding properties of a new class of linked anthramycin analogs. *Nucleic Acids Res*. 1991 Feb 25;19(4):899-903. doi: 10.1093/nar/19.4.899. PMID: 1708126; PMCID: PMC333728.

Fida TT, Palamuru S, Pandey G, Spain JC. Aerobic biodegradation of 2,4-Dinitroanisole by *Nocardioides* sp. strain JS1661. *Appl Environ Microbiol*. 2014 Dec;80(24):7725-31. doi: 10.1128/AEM.02752-14. Epub 2014 Oct 3. PMID: 25281383; PMCID: PMC4249229.

Fisher AJ, Thompson TB, Thoden JB, Baldwin TO, Rayment I. The 1.5-Å resolution crystal structure of bacterial luciferase in low salt conditions. *J Biol Chem*. 1996 Sep 6;271(36):21956-68. doi: 10.1074/jbc.271.36.21956. PMID: 8703001.

Fischbach MA, Walsh CT, Clardy J. The evolution of gene collectives: How natural selection drives chemical innovation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Mar 25;105(12):4601-8. doi: 10.1073/pnas.0709132105. Epub 2008 Jan 23. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 3;106(5):1679. PMID: 18216259; PMCID: PMC2290807.

Fotso S, Zabriskie TM, Proteau PJ, Flatt PM, Santosa DA, Mahmud T. Limazepines A-F, pyrrolo[1,4]benzodiazepine Antibiotics from an Indonesian *Micrococcus* sp. *J Nat Prod*. 2009 Apr;72(4):690-5. doi: 10.1021/np800827w. Erratum in: *J Nat Prod*. 2016 Jan 22;79(1):259. PMID: 19388705.

Fujii K, Sivonen K, Adachi K, Noguchi K. Comparative Study of Toxic and Non-toxic Cyanobacterial Products. *Tetrahedron*. 1997;38(31):5525-5528.

Gademann, Karl and Cyril Portmann. "Secondary Metabolites from Cyanobacteria: Complex Structures and Powerful Bioactivities." *Current Organic Chemistry* 12 (2008): 326-341.

*Gerratana B. Biosynthesis, synthesis, and biological activities of pyrrolobenzodiazepines. *Med Res Rev*. 2012 Mar;32(2):254-93. doi: 10.1002/med.20212. Epub 2010 Jun 13. PMID: 20544978; PMCID: PMC4127195.

Gorris LG, van der Drift C. Cofactor contents of methanogenic bacteria reviewed. *Biofactors*. 1994 May;4(3-4):139-45. PMID: 7916957.

*Greening C, Ahmed FH, Mohamed AE, Lee BM, Pandey G, Warden AC, Scott C, Oakeshott JG, Taylor MC, Jackson CJ. Physiology, Biochemistry, and Applications of F420- and Fo-Dependent Redox Reactions. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016 Apr 27;80(2):451-93. doi: 10.1128/MMBR.00070-15. PMID: 27122598; PMCID: PMC4867364.

Gregson SJ, Howard PW, Barcella S, Nakamya A, Jenkins TC, Kelland LR, Thurston DE. Effect of C2/C3-endo unsaturation on the cytotoxicity and DNA-binding reactivity of pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines. *Bioorg Med Chem Lett*. 2000 Aug 21;10(16):1849-51. doi: 10.1016/S0960-894X(00)00350-4. PMID: 10969983.

Grinter R, Greening C. Cofactor F420: an expanded view of its distribution, biosynthesis and roles in bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev*. 2021 Sep 8;45(5):fuab021. doi: 10.1093/femsre/fuab021. PMID: 33851978; PMCID: PMC8498797.

*Guerriero G, Berni R, Muñoz-Sánchez JA, Apone F, Abdel-Salam EM, Qahtan AA, Alatar AA, Cantini C, Cai G, Hausman JF, Siddiqui KS, Hernández-Sotomayor SMT, Faisal M. Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists. *Genes (Basel)*. 2018 Jun 20;9(6):309. doi: 10.3390/genes9060309. PMID: 29925808; PMCID: PMC6027220.

Guo J, Harn N, Robbins A, Dougherty R, Middaugh CR. Stability of helix-rich proteins at high concentrations. *Biochemistry*. 2006 Jul 18;45(28):8686-96. doi: 10.1021/bi060525p. PMID: 16834343.

Guzman J., Kadlčík S., Kameník Z., Brazdova L., Pavlikova M., Gazak R., Vimberg V., Zapal J., Kuzma M., Najmanova L., Janata J. (2020) Intervencin, a lincosamide antibiotic mined from *Rhodococcus* genome.

Hagemeier CH, Shima S, Thauer RK, Bourenkov G, Bartunik HD, Ermler U. Coenzyme F420-dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase (Mtd) from *Methanopyrus kandleri*: a methanogenic enzyme with an unusual quaternary structure. *J Mol Biol*. 2003 Oct 3;332(5):1047-57. doi: 10.1016/S0022-2836(03)00949-5. PMID: 14499608.

Hanada M, Tsunakawa M, Tomita K, Tsukiura H, Kawaguchi H. Antibiotic Bu-2545, a new member of the celesticetin-lincomycin class. *J Antibiot (Tokyo)*. 1980 Jul;33(7):751-3. doi: 10.7164/antibiotics.33.751. PMID: 7410215.

Hartley JA, Spanswick VJ, Brooks N, Clingen PH, McHugh PJ, Hochhauser D, Pedley RB, Kelland LR, Alley MC, Schultz R, Hollingshead MG, Schweikart KM, Tomaszewski JE, Sausville EA, Gregson SJ, Howard PW, Thurston DE. SJG-136 (NSC 694501), a novel rationally designed DNA minor groove interstrand cross-linking agent with potent and broad spectrum antitumor activity: part 1: cellular pharmacology, in vitro and initial in vivo antitumor activity. *Cancer Res*. 2004 Sep 15;64(18):6693-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-2941. PMID: 15374986.

*Hassell AM, An G, Bledsoe RK, Bynum JM, Carter HL 3rd, Deng SJ, Gampe RT, Grisard TE, Madauss KP, Nolte RT, Rocque WJ, Wang L, Weaver KL, Williams SP, Wisely GB, Xu R, Shewchuk LM. Crystallization of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2007 Jan;63(Pt 1):72-9. doi: 10.1107/S0907444906047020. Epub 2006 Dec 13. PMID: 17164529; PMCID: PMC2483499.

Heiss G, Hofmann KW, Trachtmann N, Walters DM, Rouvière P, Knackmuss HJ. npd gene functions of *Rhodococcus (opacus) erythropolis* HL PM-1 in the initial steps of 2,4,6-trinitrophenol degradation. *Microbiology (Reading)*. 2002 Mar;148(Pt 3):799-806. doi: 10.1099/00221287-148-3-799. PMID: 11882715.

Heldermon CD, Tlapak-Simmons VL, Baggenstoss BA, Weigel PH. Site-directed mutation of conserved cysteine residues does not inactivate the *Streptococcus pyogenes* hyaluronan synthase. *Glycobiology*. 2001 Dec;11(12):1017-24. doi: 10.1093/glycob/11.12.1017. PMID: 11805074; PMCID: PMC4042541.

Hoeksema H. Celesticetin. V. The structure of celesticetin. *J Am Chem Soc*. 1968 Jan 31;90(3):755-7. doi: 10.1021/ja01005a036. PMID: 5638307.

Hoeksema H., B. Bannister, R. D. Birkenmeyer, F. Kagan, B. J. Magerlein, F. A. MacKellar, W. Schroeder, G. Slomp, and R. R. Herr. Chemical Studies on Lincomycin. I. The Structure of Lincomycin. *J. Am. Chem. Soc.* 1964, 86, 19, 4223-4224. <https://doi.org/10.1021/ja01073a083>

Hoeksema Herman, James L. Johnson, and Jack W. Hinman *Journal of the American Chemical Society* 1955 77 (24), 6710-6711 DOI: 10.1021/ja01629a129

Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science.* 1975 Jan 24;187(4173):226-32. PMID: 1111098.

Höfer I, Crüsemann M, Radzom M, Geers B, Flachshaar D, Cai X, Zeeck A, Piel J. Insights into the biosynthesis of hormaomycin, an exceptionally complex bacterial signaling metabolite. *Chem Biol.* 2011 Mar 25;18(3):381-91. doi: 10.1016/j.chembiol.2010.12.018. PMID: 21439483.

Hu Y, Phelan V, Ntai I, Farnet CM, Zazopoulos E, Bachmann BO. Benzodiazepine biosynthesis in *Streptomyces refuineus*. *Chem Biol.* 2007 Jun;14(6):691-701. doi: 10.1016/j.chembiol.2007.05.009. Erratum in: *Chem Biol.* 2007 Jul;14(7):870. PMID: 17584616.

Huang YT, Lyu SY, Chuang PH, Hsu NS, Li YS, Chan HC, Huang CJ, Liu YC, Wu CJ, Yang WB, Li TL. In vitro characterization of enzymes involved in the synthesis of nonproteinogenic residue (2S,3S)-beta-methylphenylalanine in glycopeptide antibiotic mannopeptimycin. *Chembiochem.* 2009 Oct 12;10(15):2480-7. doi: 10.1002/cbic.200900351. PMID: 19731276.

Hurley LH, Gairola C, Das NV. Pyrrolo[1,4]benzodiazepine antibiotics. Biosynthesis of the antitumor antibiotic 11-demethyltomaymycin and its biologically inactive metabolite oxotomaymycin by *Streptomyces achromogenes*. *Biochemistry.* 1976 Aug 24;15(17):3760-9. doi: 10.1021/bi00662a019. PMID: 1085163.

Hurley LH, Lasswell WL, Ostrander JM, Parry R. Pyrrolo[1,4]benzodiazepine antibiotics. Biosynthetic conversion of tyrosine to the C2- and C3-proline moieties of anthramycin, tomaymycin, and sibiromycin. *Biochemistry.* 1979 Sep 18;18(19):4230-7. doi: 10.1021/bi00586a030. PMID: 582801.

Hurley LH, Zmijewski M, Chang CJ. Biosynthesis of anthramycin. Determination of the labeling pattern by the use of radioactive and stable isotope techniques. *J Am Chem Soc.* 1975 Jul 23;97(15):4372-8. doi: 10.1021/ja00848a040. PMID: 1141599.

Cheeseman P, Toms-Wood A, Wolfe RS. Isolation and properties of a fluorescent compound, factor 420, from *Methanobacterium* strain M.o.H. *J Bacteriol.* 1972 Oct;112(1):527-31. doi: 10.1128/jb.112.1.527-531.1972. PMID: 5079072; PMCID: PMC251440.

Isabelle D, Simpson DR, Daniels L. Large-scale production of coenzyme F420-5,6 by using *Mycobacterium smegmatis*. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Nov;68(11):5750-5. doi: 10.1128/AEM.68.11.5750-5755.2002. PMID: 12406775; PMCID: PMC129890.

*Jakubiec-Krzesniak K, Rajnisz-Mateusiak A, Guspiel A, Ziemska J, Solecka J. Secondary Metabolites of Actinomycetes and their Antibacterial, Antifungal and Antiviral Properties. *Pol J Microbiol.* 2018;67(3):259-272. doi: 10.21307/pjm-2018-048. PMID: 30451442; PMCID: PMC7256786.

*Janata J, Kameník Z, Gazak R, Kadlčík S, Najmanova L. Biosynthesis and incorporation of an alkylproline-derivative (APD) precursor into complex natural products. *Nat Prod Rep.* 2018 Mar 1;35(3):257-289. doi: 10.1039/c7np00047b. Epub 2018 Mar 8. PMID: 29517100.

Jirásková P, Gazak R, Kameník Z, Steiningerová L, Najmanova L, Kadlčík S, Novotná J, Kuzma M, Janata J. New Concept of the Biosynthesis of 4-Alkyl-L-Proline Precursors of Lincomycin, Hormaomycin, and Pyrrolobenzodiazepines: Could a γ -Glutamyltransferase Cleave the C-C Bond? *Front Microbiol.* 2016 Mar 7;7:276. doi: 10.3389/fmicb.2016.00276. PMID: 27014201; PMCID: PMC4780272.

Jones JJ, Falkinham JO 3rd. Decolorization of malachite green and crystal violet by waterborne pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Jul;47(7):2323-6. doi: 10.1128/AAC.47.7.2323-2326.2003. PMID: 12821489; PMCID: PMC161881.

Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Židek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021 Aug;596(7873):583-589. doi: 10.1038/s41586-021-03819-2. Epub 2021 Jul 15. PMID: 34265844; PMCID: PMC8371605.

Kadlčík S, Kameník Z, Vasek D, Nedved M, Janata J. Elucidation of salicylate attachment in celesticetin biosynthesis opens the door to create a library of more efficient hybrid lincosamide antibiotics. *Chem Sci*. 2017 May 1;8(5):3349-3355. doi: 10.1039/c6sc04235j. Epub 2017 Mar 23. PMID: 28507704; PMCID: PMC5416915.

Kameník Z, Gazak R, Kadlčík S, Steiningerová L, Rynd V, Janata J. C-C bond cleavage in biosynthesis of 4-alkyl-L-proline precursors of lincomycin and anthramycin cannot precede C-methylation. *Nat Commun*. 2018 Aug 9;9(1):3167. doi: 10.1038/s41467-018-05455-3. PMID: 30093642; PMCID: PMC6085390.

Kameník Z, Kadlčík S, Radojevic B, Jirásková P, Kuzma M, Gazak R, Najmanova L, Kopecký J, Janata J. Deacetylation of mycothiol-derived 'waste product' triggers the last biosynthetic steps of lincosamide antibiotics. *Chem Sci*. 2016 Jan 1;7(1):430-435. doi: 10.1039/c5sc03327f. Epub 2015 Oct 1. PMID: 28791100; PMCID: PMC5518657.

Kariyone K, Yazawa H, Kohsaka M. The Structures of Tomaymycin and Oxotomaymycin. *Chem Pharm Bull*. 1971;19(11):2289-2293

*Katz L, Baltz RH. Natural product discovery: past, present, and future. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2016 Mar;43(2-3):155-76. doi: 10.1007/s10295-015-1723-5. Epub 2016 Jan 6. PMID: 26739136.

Kling A, Lukat P, Almeida DV, Bauer A, Fontaine E, Sordello S, Zaburannyi N, Herrmann J, Wenzel SC, König C, Ammerman NC, Barrio MB, Borchers K, Bordon-Pallier F, Brönstrup M, Courtemanche G, Gerlitz M, Geslin M, Hammann P, Heinz DW, Hoffmann H, Klieber S, Kohlmann M, Kurz M, Lair C, Matter H, Nuermberger E, Tyagi S, Fraise L, Grosset JH, Lagrange S, Müller R. Antibiotics. Targeting DnaN for tuberculosis therapy using novel griselimycins. *Science*. 2015 Jun 5;348(6239):1106-12. doi: 10.1126/science.aaa4690. PMID: 26045430.

Knox HL, Chen PY, Blaszczyk AJ, Mukherjee A, Grove TL, Schwalm EL, Wang B, Drennan CL, Booker SJ. Structural basis for non-radical catalysis by TsrM, a radical SAM methylase. *Nat Chem Biol*. 2021 Apr;17(4):485-491. doi: 10.1038/s41589-020-00717-y. Epub 2021 Jan 18. PMID: 33462497; PMCID: PMC7990684.

Koběrská M, Kopecký J, Olsovská J, Jelínková M, Ulanova D, Man P, Flieger M, Janata J. Sequence analysis and heterologous expression of the lincomycin biosynthetic cluster of the type strain *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466. *Folia Microbiol (Praha)*. 2008;53(5):395-401. doi: 10.1007/s12223-008-0060-8. Epub 2008 Dec 16. PMID: 19085073.

Kopka ML, Goodsell DS, Baikalov I, Grzeskowiak K, Cascio D, Dickerson RE. Crystal structure of a covalent DNA-drug adduct: anthramycin bound to C-C-A-A-C-G-T-T-G-G and a molecular explanation of specificity. *Biochemistry*. 1994 Nov 22;33(46):13593-610. doi: 10.1021/bi00250a011. PMID: 7947769.

Kotecha M, Kluza J, Wells G, O'Hare CC, Forni C, Mantovani R, Howard PW, Morris P, Thurston DE, Hartley JA, Hochhauser D. Inhibition of DNA binding of the NF-Y transcription factor

by the pyrrolbenzodiazepine-polyamide conjugate GWL-78. *Mol Cancer Ther.* 2008 May;7(5):1319-28. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0475. PMID: 18483319.

Krepkiy D, Miziorko HM. Identification of active site residues in mevalonate diphosphate decarboxylase: implications for a family of phosphotransferases. *Protein Sci.* 2004 Jul;13(7):1875-81. doi: 10.1110/ps.04725204. Epub 2004 May 28. PMID: 15169949; PMCID: PMC2279928.

*Krulwich TA, Sachs G, Padan E. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nat Rev Microbiol.* 2011 May;9(5):330-43. doi: 10.1038/nrmicro2549. Epub 2011 Apr 5. PMID: 21464825; PMCID: PMC3247762.

Kuo MS, Yurek DA, Coats JH, Chung ST, Li GP. Isolation and identification of 3-propylidene-delta 1-pyrroline-5-carboxylic acid, a biosynthetic precursor of lincomycin. *J Antibiot (Tokyo).* 1992 Nov;45(11):1773-7. doi: 10.7164/antibiotics.45.1773. PMID: 1468986.

Lan H, Liu H, Ye Y, Yin Z. The Role of Surface Properties on Protein Aggregation Behavior in Aqueous Solution of Different pH Values. *AAPS PharmSciTech.* 2020 Apr 26;21(4):122. doi: 10.1208/s12249-020-01663-7. PMID: 32337617.

Leimgruber W, Batcho AD, Schenker F. The structure of anthramycin. *J Am Chem Soc.* 1965 Dec 20;87(24):5793-5. doi: 10.1021/ja00952a051. PMID: 5845428.

Levy N, Eiler S, Pradeau-Aubretton K, Maillot B, Stricher F, Ruff M. Production of unstable proteins through the formation of stable core complexes. *Nat Commun.* 2016 Mar 17;7:10932. doi: 10.1038/ncomms10932. PMID: 26983699; PMCID: PMC4800440.

Li DF, Feng L, Hou YJ, Liu W. The expression, purification and crystallization of a ubiquitin-conjugating enzyme E2 from *Agroclybe aegerita* underscore the impact of His-tag location on recombinant protein properties. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2013 Feb 1;69(Pt 2):153-7. doi: 10.1107/S1744309112051755. Epub 2013 Jan 31. PMID: 23385757; PMCID: PMC3564618.

Li MQ, Zhang HB, Li Y, Hu XQ, Yang JW. The thermoduric effects of site-directed mutagenesis of proline and lysine on dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* 0326. *Int J Biol Macromol.* 2018 Feb;107(Pt B):1641-1649. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.023. Epub 2017 Oct 9. PMID: 29024683.

Li W, Chou S, Khullar A, Gerratana B. Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster for tomaymycin, an SJG-136 monomeric analog. *Appl Environ Microbiol.* 2009 May;75(9):2958-63. doi: 10.1128/AEM.02325-08. Epub 2009 Mar 6. PMID: 19270147; PMCID: PMC2681672. (a)

Li W, Khullar A, Chou S, Sacramo A, Gerratana B. Biosynthesis of sibiromycin, a potent antitumor antibiotic. *Appl Environ Microbiol.* 2009 May;75(9):2869-78. doi: 10.1128/AEM.02326-08. Epub 2009 Mar 6. PMID: 19270142; PMCID: PMC2681668. (b)

Lin XL, White RH. Occurrence of coenzyme F420 and its gamma-monoglutamyl derivative in nonmethanogenic archaeobacteria. *J Bacteriol.* 1986 Oct;168(1):444-8. doi: 10.1128/jb.168.1.444-448.1986. PMID: 3093465; PMCID: PMC213475.

*Liscombe DK, Louie GV, Noel JP. Architectures, mechanisms and molecular evolution of natural product methyltransferases. *Nat Prod Rep.* 2012 Oct;29(10):1238-50. doi: 10.1039/c2np20029e. Epub 2012 Aug 1. PMID: 22850796.

Liu Y, Zhang Y, Cao X, Xue S. Cloning, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of MCAT from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2013 Nov;69(Pt 11):1256-9. doi: 10.1107/S1744309113026274. Epub 2013 Oct 30. PMID: 24192363; PMCID: PMC3818047.

Lukat P, Katsuyama Y, Wenzel S, Binz T, König C, Blankenfeldt W, Brönstrup M, Müller R. Biosynthesis of methyl-proline containing griselimycins, natural products with anti-tuberculosis activity. *Chem Sci*. 2017 Nov 1;8(11):7521-7527. doi: 10.1039/c7sc02622f. Epub 2017 Aug 3. PMID: 29163906; PMCID: PMC5676206.

*Magerlein BJ. Modification of lincomycin. *Adv Appl Microbiol*. 1971;14:185-229. doi: 10.1016/s0065-2164(08)70544-6. PMID: 5003687.

*Martin JL, McMillan FM. SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Curr Opin Struct Biol*. 2002 Dec;12(6):783-93. doi: 10.1016/s0959-440x(02)00391-3. Erratum in: *Curr Opin Struct Biol*. 2003 Feb;13(1):142. PMID: 12504684.

Mascotti ML, Juri Ayub M, Fraaije MW. On the diversity of F420 -dependent oxidoreductases: A sequence- and structure-based classification. *Proteins*. 2021 Nov;89(11):1497-1507. doi: 10.1002/prot.26170. Epub 2021 Jul 16. PMID: 34216160; PMCID: PMC8518648.

Mascotti ML, Kumar H, Nguyen QT, Ayub MJ, Fraaije MW. Reconstructing the evolutionary history of F420-dependent dehydrogenases. *Sci Rep*. 2018 Dec 4;8(1):17571. doi: 10.1038/s41598-018-35590-2. PMID: 30514849; PMCID: PMC6279831.

Matzov D, Eyal Z, Benhamou RI, Shalev-Benami M, Halfon Y, Krupkin M, Zimmerman E, Rozenberg H, Bashan A, Fridman M, Yonath A. Structural insights of lincosamides targeting the ribosome of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res*. 2017 Sep 29;45(17):10284-10292. doi: 10.1093/nar/gkx658. PMID: 28973455; PMCID: PMC5622323.

*McPherson A, DeLucas LJ. Microgravity protein crystallization. *NPJ Microgravity*. 2015 Sep 3;1:15010. doi: 10.1038/npjmgrav.2015.10. PMID: 28725714; PMCID: PMC5515504.

*McPherson A, Gavira JA. Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 2014 Jan;70(Pt 1):2-20. doi: 10.1107/S2053230X13033141. Epub 2013 Dec 24. PMID: 24419610; PMCID: PMC3943105.

Medema MH, Fischbach MA. Computational approaches to natural product discovery. *Nat Chem Biol*. 2015 Sep;11(9):639-48. doi: 10.1038/nchembio.1884. PMID: 26284671; PMCID: PMC5024737.

Mesentsev AS, Kuljaeva VV, Rubasheva LM. Structure of sibiromycin. *J Antibiot (Tokyo)*. 1974 Nov;27(11):866-73. doi: 10.7164/antibiotics.27.866. PMID: 4452659.

Meyers BR, Kaplan K, Weinstein L. Microbiological and pharmacological behavior of 7-chlorolincomycin. *Appl Microbiol*. 1969 May;17(5):653-7. doi: 10.1128/am.17.5.653-657.1969. PMID: 4389137; PMCID: PMC377774.

Najmanová L, Ulanova D, Jelinkova M, Kameník Z, Kettnerova E, Koberska M, Gazak R, Radojevic B, Janata J. Sequence analysis of porothramycin biosynthetic gene cluster. *Folia Microbiol (Praha)*. 2014 Nov;59(6):543-52. doi: 10.1007/s12223-014-0339-x. Epub 2014 Aug 16. PMID: 25128200; PMCID: PMC4194701.

Nakashima Y, Nii H, Janowiak BE, Griffith OW, Hibi T. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of bifunctional gamma-glutamylcysteine synthetase-glutathione synthetase from *Streptococcus agalactiae*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2009 Jul 1;65(Pt 7):678-80. doi: 10.1107/S1744309109018636. Epub 2009 Jun 27. PMID: 19574637; PMCID: PMC2705632.

Neusser D, Schmidt H, Spizèk J, Novotná J, Peschke U, Kaschabeck S, Tichy P, Piepersberg W. The genes *lmbB1* and *lmbB2* of *Streptomyces lincolnensis* encode enzymes involved in the conversion of L-tyrosine to propylproline during the biosynthesis of the antibiotic lincomycin A. *Arch Microbiol*. 1998 Apr;169(4):322-32. doi: 10.1007/s002030050578. PMID: 9531633.

Ney B, Ahmed FH, Carere CR, Biswas A, Warden AC, Morales SE, Pandey G, Watt SJ, Oakeshott JG, Taylor MC, Stott MB, Jackson CJ, Greening C. The methanogenic redox cofactor F420 is widely synthesized by aerobic soil bacteria. *ISME J.* 2017 Jan;11(1):125-137. doi: 10.1038/ismej.2016.100. Epub 2016 Aug 9. PMID: 27505347; PMCID: PMC5315465.

Nguyen QT, Trinco G, Binda C, Mattevi A, Fraaije MW. Discovery and characterization of an F420-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase (Rh-FGD1) from *Rhodococcus jostii* RHA1. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017 Apr;101(7):2831-2842. doi: 10.1007/s00253-016-8038-y. Epub 2016 Dec 13. PMID: 27966048; PMCID: PMC5352752.

Novotná J, Honzátko A, Bednár P, Kopecký J, Janata J, Spížek J. 1-3,4-Dihydroxyphenyl alanine-extradial cleavage is followed by intramolecular cyclization in lincomycin biosynthesis. *Eur J Biochem.* 2004 Sep;271(18):3678-83. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04308.x. PMID: 15355345.

Novotná J, Olsovska J, Novak P, Mojzes P, Chaloupkova R, Kameník Z, Spizek J, Kutejova E, Mareckova M, Tichy P, Damborsky J, Janata J. Lincomycin biosynthesis involves a tyrosine hydroxylating heme protein of an unusual enzyme family. *PLoS One.* 2013 Dec 4;8(12):e79974. doi: 10.1371/journal.pone.0079974. PMID: 24324587; PMCID: PMC3851162.

Nyfelner R, Keller-Schierlein W. *Metabolites of Microorganisms.* 143. Echinocandin B, a Novel Polypeptide-171 Antibiotic from *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus*: Isolation and Structural Components. *Helv Chim Acta.* 1974;57(8):2459-2477.

Omura S, Mamada H, Wang NJ, Imamura N, Oiwa R, Iwai Y, Muto N. Takaokamycin, a new peptide antibiotic produced by *Streptomyces* sp. *J Antibiot (Tokyo).* 1984 Jul;37(7):700-5. doi: 10.7164/antibiotics.37.700. PMID: 6732903.

*O'Hagan D, Schmidberger JW. Enzymes that catalyse SN2 reaction mechanisms. *Nat Prod Rep.* 2010 Jun;27(6):900-18. doi: 10.1039/b919371p. Epub 2010 Apr 7. PMID: 20372740.

Pagani, S., Vecchio, G., Iametti, S., Bianchi, R., & Bonomi, F. (1986). On the role of the 2Fe-2S cluster in the formation of the structure of spinach ferredoxin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 870(3), 538-544. doi:10.1016/0167-4838(86)90263-3

Peschke U, Schmidt H, Zhang HZ, Piepersberg W. Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol Microbiol.* 1995 Jun;16(6):1137-56. doi: 10.1111/j.1365-2958.1995.tb02338.x. PMID: 8577249.

Pica A, Russo Krauss I, Castellano I, La Cara F, Graziano G, Sica F, Merlino A. Effect of NaCl on the conformational stability of the thermophilic γ -glutamyltranspeptidase from *Geobacillus thermodenitrificans*: Implication for globular protein halotolerance. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Jan;1834(1):149-57. doi: 10.1016/j.bbapap.2012.09.014. Epub 2012 Oct 2. PMID: 23036908.

Pichlo C, Montada AA, Schacherl M, Baumann U. Production, Crystallization and Structure Determination of *C. difficile* PPEP-1 via Microseeding and Zinc-SAD. *J Vis Exp.* 2016 Dec 30;(118):55022. doi: 10.3791/55022. PMID: 28060332; PMCID: PMC5226640.

Purwantini E, Mukhopadhyay B. Rv0132c of *Mycobacterium tuberculosis* encodes a coenzyme F420-dependent hydroxymycolic acid dehydrogenase. *PLoS One.* 2013 Dec 11;8(12):e81985. doi: 10.1371/journal.pone.0081985. PMID: 24349169; PMCID: PMC3859598.

Reid R, Greene PJ, Santi DV. Exposition of a family of RNA m(5)C methyltransferases from searching genomic and proteomic sequences. *Nucleic Acids Res.* 1999 Aug 1;27(15):3138-45. doi: 10.1093/nar/27.15.3138. PMID: 10454610; PMCID: PMC148540.

Saha S, Li W, Gerratana B, Rokita SE. Identification of the dioxygenase-generated intermediate formed during biosynthesis of the dihydropyrrole moiety common to anthramycin and sibiromycin. *Bioorg Med Chem.* 2015 Feb 1;23(3):449-54. doi: 10.1016/j.bmc.2014.12.024. Epub 2014 Dec 20. PMID: 25564379; PMCID: PMC4302019.

Sauvé V, Sygusch J. Crystallization and preliminary X-ray analysis of native and selenomethionine fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Thermus aquaticus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2001 Feb;57(Pt 2):310-3. doi: 10.1107/s0907444900019727. PMID: 11173490.

Sedgwick H, Cameron JE, Poon WC, Egelhaaf SU. Protein phase behavior and crystallization: effect of glycerol. *J Chem Phys*. 2007 Sep 28;127(12):125102. doi: 10.1063/1.2771168. PMID: 17902938.

Serrano-Posada H, Valderrama B, Stojanoff V, Rudiño-Piñera E. Thermostable multicopper oxidase from *Thermus thermophilus* HB27: crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of apo and holo forms. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2011 Dec 1;67(Pt 12):1595-8. doi: 10.1107/S174430911103805X. Epub 2011 Nov 26. PMID: 22139175; PMCID: PMC3232148.

Schlesinger AP, Wang Y, Tadeo X, Millet O, Pielak GJ. Macromolecular crowding fails to fold a globular protein in cells. *J Am Chem Soc*. 2011 Jun 1;133(21):8082-5. doi: 10.1021/ja201206t. Epub 2011 May 10. PMID: 21534566; PMCID: PMC3102155.

Schroeder W, Bannister B, Hoeksema H. Lincomycin. 3. The structure and stereochemistry of the carbohydrate moiety. *J Am Chem Soc*. 1967 May 10;89(10):2448-53. doi: 10.1021/ja00986a036. PMID: 6042749.

*Schönherr H, Cernak T. Profound methyl effects in drug discovery and a call for new C-H methylation reactions. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2013 Nov 18;52(47):12256-67. doi: 10.1002/anie.201303207. Epub 2013 Oct 22. PMID: 24151256

Steiningerová L, Kameník Z, Gazak R, Kadlčík S, Bashiri G, Man P, Kuzma M, Pavlikova M, Janata J. Different Reaction Specificities of F420H2-Dependent Reductases Facilitate Pyrrolobenzodiazepines and Lincomycin To Fit Their Biological Targets. *J Am Chem Soc*. 2020 Feb 19;142(7):3440-3448. doi: 10.1021/jacs.9b11234. Epub 2020 Jan 28. PMID: 31944685.

Steiningerová, L. (2020a): Úloha F420H2-závislých reductas v biosyntéze bioaktivních mikrobiálních metabolitů inkorpoujících 4-alkyl-L-prolinový derivát. Dizertační práce. Katedra genetiky a mikrobiologie. Přf UK, Praha

Steiningerová, L. (2015): Funkce proteinu LmbW v biosyntéze antibiotika linkomycinu. Diplomová práce. Katedra genetiky a mikrobiologie. Přf UK, Praha

Stetter KO, Lauerer G, Thomm M, Neuner A. Isolation of extremely thermophilic sulfate reducers: evidence for a novel branch of archaeobacteria. *Science*. 1987 May 15;236(4803):822-4. doi: 10.1126/science.236.4803.822. PMID: 17777850.

*Struck AW, Thompson ML, Wong LS, Micklefield J. S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferases: highly versatile enzymes in biocatalysis, biosynthesis and other biotechnological applications. *Chembiochem*. 2012 Dec 21;13(18):2642-55. doi: 10.1002/cbic.201200556. Epub 2012 Nov 23. PMID: 23180741.

*Sun Q, Huang M, Wei Y. Diversity of the reaction mechanisms of SAM-dependent enzymes. *Acta Pharm Sin B*. 2021 Mar;11(3):632-650. doi: 10.1016/j.apsb.2020.08.011. Epub 2020 Aug 26. PMID: 33777672; PMCID: PMC7982431.

Taylor MC, Jackson CJ, Tattersall DB, French N, Peat TS, Newman J, Briggs LJ, Lapalikar GV, Campbell PM, Scott C, Russell RJ, Oakeshott JG. Identification and characterization of two families of F420 H2-dependent reductases from *Mycobacteria* that catalyse aflatoxin degradation. *Mol Microbiol*. 2010 Nov;78(3):561-75. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07356.x. Epub 2010 Sep 16. PMID: 20807200; PMCID: PMC3034190.

*Taylor M, Scott C, Grogan G. F420-dependent enzymes - potential for applications in biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2013 Feb;31(2):63-4. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.09.003. Epub 2012 Oct 23. PMID: 23098999.

TENDLER MD, KORMAN S. 'REFUIN': A NON-CYTOTOXIC CARCINOSTATIC COMPOUND PROLIFERATED BY A THERMOPHILIC ACTINOMYCETE. *Nature*. 1963 Aug 3;199:501. doi: 10.1038/199501a0. PMID: 14058616.

Terlain B, Thomas J. Constitution of Griselimycin, Polypeptide Antibiotic Extracted from Cultures *Streptomyces*. 1. Identification of Substances Obtained by Hydrolysis. *Bull Soc Chim Fr*. 1971;(6). PMID: 5568644.

Tesmar A, Hoffmann M, Pippel J, Fayad AA, Dausend-Werner S, Bauer A, Blankenfeldt W, Müller R. Total Biosynthesis of the Pyrrolo[4,2]benzodiazepine Scaffold Tomaymycin on an In Vitro Reconstituted NRPS System. *Cell Chem Biol*. 2017 Oct 19;24(10):1216-1227.e8. doi: 10.1016/j.chembiol.2017.08.001. Epub 2017 Sep 7. PMID: 28890318.

Thakur AS, Robin G, Guncar G, Saunders NF, Newman J, Martin JL, Kobe B. Improved success of sparse matrix protein crystallization screening with heterogeneous nucleating agents. *PLoS One*. 2007 Oct 31;2(10):e1091. doi: 10.1371/journal.pone.0001091. PMID: 17971854; PMCID: PMC2034409.

Thornton JM, Sibanda BL. Amino and carboxy-terminal regions in globular proteins. *J Mol Biol*. 1983 Jun 25;167(2):443-60. doi: 10.1016/s0022-2836(83)80344-1. PMID: 6864804.

Thurston DE, Bose DS, Howard PW, Jenkins TC, Leoni A, Baraldi PG, Guiotto A, Cacciari B, Kelland LR, Foloppe MP, Rault S. Effect of A-ring modifications on the DNA-binding behavior and cytotoxicity of pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines. *J Med Chem*. 1999 Jun 3;42(11):1951-64. doi: 10.1021/jm981117p. PMID: 10354403.

Toda S, Nakagawa S, Naito T, Kawaguchi H. Structure of antibiotic Bu-2545, a new member of the celesticetin-lincomycin class. *J Antibiot (Tokyo)*. 1981 May;34(5):596-9. doi: 10.7164/antibiotics.34.596. PMID: 7275840.

Tsunakawa M, Kamei H, Konishi M, Miyaki T, Oki T, Kawaguchi H. Porothramycin, a new antibiotic of the anthramycin group: production, isolation, structure and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)*. 1988 Oct;41(10):1366-73. doi: 10.7164/antibiotics.41.1366. PMID: 3192492.

Ulanova D, Novotná J, Smutná Y, Kameník Z, Gazák R, Sulc M, Sedmera P, Kadlcík S, Plháčková K, Janata J. Mutasythesis of lincomycin derivatives with activity against drug-resistant staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Feb;54(2):927-30. doi: 10.1128/AAC.00918-09. Epub 2009 Nov 16. PMID: 19917754; PMCID: PMC2812159.

Vagenende V, Yap MG, Trout BL. Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry*. 2009 Nov 24;48(46):11084-96. doi: 10.1021/bi900649t. PMID: 19817484.

*Vardanyan R.S., V.J. Hruby, in *Synthesis of Essential Drugs*, 2006

Váró G, Lanyi JK. Photoreactions of bacteriorhodopsin at acid pH. *Biophys J*. 1989 Dec;56(6):1143-51. doi: 10.1016/S0006-3495(89)82761-4. PMID: 2611328; PMCID: PMC1280617.

Vera, L., Czarny, B., Georgiadis, D., Dive, V., & Stura, E. A. (2011). Practical Use of Glycerol in Protein Crystallization. *Crystal Growth & Design*, 11(7), 2755-2762. doi:10.1021/cg101364m 10.1021/cg101364m

Vogel R, Siebert F. Conformation and stability of alpha-helical membrane proteins. 2. Influence of pH and salts on stability and unfolding of rhodopsin. *Biochemistry*. 2002 Mar 19;41(11):3536-45. doi: 10.1021/bi016024f. PMID: 11888269.

*Wittung-Stafshede P. Role of cofactors in protein folding. *Acc Chem Res*. 2002 Apr;35(4):201-8. doi: 10.1021/ar010106e. PMID: 11955048.

Witz DF, Hessler EJ, Miller TL. Bioconversion of tyrosine into the propylhygric acid moiety of lincomycin. *Biochemistry*. 1971 Mar 30;10(7):1128-33. doi: 10.1021/bi00783a005. PMID: 5553319.

Wowor AJ, Yan Y, Auclair SM, Yu D, Zhang J, May ER, Gross ML, Kendall DA, Cole JL. Analysis of SecA dimerization in solution. *Biochemistry*. 2014 May 20;53(19):3248-60. doi: 10.1021/bi500348p. Epub 2014 May 9. PMID: 24786965; PMCID: PMC4030788.

Wright H., Williams A., Wilkinson A., Harper L., Savin K., and Wilson A. M. An Analysis of Publicly Available Microgravity Crystallization Data: Emergent Themes Across Crystal Types. *Crystal Growth & Design* 2022 22 (12), 6849-6851. DOI: 10.1021/acs.cgd.2c01056

Zdvořáková et al. The structure of native coenzyme F420H2-dependent oxidoreductase from *Streptomyces lincolnensis*, v přípravě

Zhang CY, Liu Y, Tian XH, Liu WJ, Li XY, Yang LX, Jiang HJ, Han C, Chen KA, Yin DC. Effect of real-world sounds on protein crystallization. *Int J Biol Macromol*. 2018 Jun;112:841-851. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.028. Epub 2018 Feb 7. PMID: 29425866.

*Zhang, C., Sultan, S.A., T, R. et al. Biotechnological applications of S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferases for natural products biosynthesis and diversification. *Bioresour. Bioprocess*. 8, 72 (2021). <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00425-y>

Zhao Q, Wang M, Xu D, Zhang Q, Liu W. Metabolic coupling of two small-molecule thiols programs the biosynthesis of lincomycin A. *Nature*. 2015 Feb 5;518(7537):115-9. doi: 10.1038/nature14137. Epub 2015 Jan 14. PMID: 25607359.

Zhong G, Chen H, Liu W. Reply to 'C-C bond cleavage in biosynthesis of 4-alkyl-L-proline precursors of lincomycin and anthramycin cannot precede C-methylation'. *Nat Commun*. 2018 Aug 9;9(1):3168. doi: 10.1038/s41467-018-05500-1. PMID: 30093620; PMCID: PMC6085292.

Zhong G, Zhao Q, Zhang Q, Liu W. 4-alkyl-L-(Dehydro)proline biosynthesis in actinobacteria involves N-terminal nucleophile-hydrolase activity of γ -glutamyltranspeptidase homolog for C-C bond cleavage. *Nat Commun*. 2017 Jul 14;8:16109. doi: 10.1038/ncomms16109. PMID: 28706296; PMCID: PMC5519988.

Zou XW, Liu YC, Hsu NS, Huang CJ, Lyu SY, Chan HC, Chang CY, Yeh HW, Lin KH, Wu CJ, Tsai MD, Li TL. Structure and mechanism of a nonhaem-iron SAM-dependent C-methyltransferase and its engineering to a hydratase and an O-methyltransferase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2014 Jun;70(Pt 6):1549-60. doi: 10.1107/S1399004714005239. Epub 2014 May 23. PMID: 24914966.

(* označené - review)