

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 5: Molekulární biologie

Přeprogramování luciferin-substrátové specifity u NanoLuc luciferázy

Tereza Šustrová
Jihomoravský kraj

Brno, 2023

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 5: Molekulární biologie

Přeprogramování luciferin-substrátové specifity u NanoLuc luciferázy

Reprogramming the luciferin-substrate specificity in NanoLuc luciferase

Autoři: Tereza Šustrová

Škola: Gymnázium Brno, třída Kapitána Jaroše, třída Kapitána Jaroše
1829/14, Brno, 658 00

Kraj: Jihomoravský kraj

Vedoucí práce: Ing. RNDr. Martin Marek, Ph.D.

Brno, 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.



V Brně dne 21. 2. 2023

Tereza Šustrová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat všem institucím, které se na mé práci podílely, mezi které patří Masarykova univerzita, výzkumné centrum Recetox, Gymnázium Brno, třída Kapitána Jaroše a Loschmidtovi laboratoře. Zároveň bych chtěla poděkovat prof. Mgr. Jiřímu Damborskému, Dr., který mi umožnil být součástí příjemné přátelské atmosféry těchto institucí

Jmenovitě bych ráda poděkovala všem členům těchto institucí, kteří mi vždy ochotně pomohli a odpověděli na každou moji otázku: Michalu Nemergutovi, Janu Tulisovi, Nikole Velátové, Ireně Halíkové, Ing. Marice Majerové a RNDr. Ivě Kubištové, Ph.D..

Veliké díky patří hlavně také Ing. Veronice Novákové a Bc. Danielu Pluskalovi, jenž mi byli v laboratoři vždy na blízku, a díky jejich velkému množství času a úsilí jsem si při projektu nejen užila nejen spoustu zábavy, ale také jsem se naučila obrovské množství nových zajímavých informací.

Nejvíce bych chtěla poděkovat svému vedoucímu práce Ing. RNDr. Martinu Markovi, Ph.D. za možnost účastnit se výzkumu světového významu, motivaci dovést tento projekt až do konce a nekonečnou trpělivost a spoustu dobrých rad při psaní samotné práce.

Nakonec bych ráda poděkovala svým kamarádům Kateřině Kolíbalové, Kateřině Chroncové, Andrejovi Gordějevovi a Vítu Procházkovi za psychickou podporu.



MUNI



Abstrakt

Bioluminiscence, tedy proces produkce a emise tzv. studeného světla živými organismy, má velký aplikační potenciál v nejrůznějších odvětvích, od základního výzkumu, biologického zobrazování až po konstrukci ekologicky šetrných světelných zdrojů. Enzymy, které generují světlo chemickou přeměnou malých organických molekul, tzv. luciferinů, se označují jako luciferázy. Výsostné místo mezi luciferázami má malá, ovšem výkonná luciferáza NanoLuc, o které prozatím nevíme, jakým způsobem generuje své modré světlo. Dalším omezením je její syntetický luciferin, tzv. furimazin, který vykazuje cytotoxické efekty, je málo rozpustný a velice drahý. V rámci této práce se nám podařilo provést strukturní analýzu komplexů NanoLuc luciferázy s oxidovanými formami luciferinů furimazinu a nativního koelenterazinu, které byly lokalizovány navázané v povrchovém, tzv. alosterickém místě. Předpokládané katalytické místo se ovšem nachází v centru molekuly, proto jsem zkonstruovala luciferázové varianty se substitucemi v alosterickém místě, abychom mohli zjistit, jak je toto alosterické místo funkčně důležité. Měření aktivity variant ukázalo výrazné zvýšení luciferázové aktivity při reakci s koelenterazinem, zatímco aktivita s furimazinem nebyla významně narušena. Poté jsem provedla krystalografickou analýzu komplexu neoxidovatelného luciferinového analogu, tzv. azakoelenterazinu, s nejvíce svítící variantou luciferázy, označenou jako NanoLuc^{CTZ}. Molekulární struktura tohoto komplexu potvrdila, že katalytické místo luciferázy se nachází uprostřed β -soudku enzymu. Znalost atomárních struktur enzym-substrátových komplexů nám umožnila navrhnout katalytický mechanismus bioluminiscenční reakce a dále mechanismus homotropní negativní alosterické regulace NanoLuc luciferázy.

Klíčová slova

bioluminiscence, luciferáza, NanoLuc, krystalografická analýza, koelenterazin, furimazin, NanoLuc^{CTZ}

Abstract

Bioluminescence, the process of production and emission of the so called cold light by living organisms has a great application potential in variety of fields, from basic research, biological imaging to construction of environmentally friendly light sources. Enzymes which generate light by chemical transformation of small organic molecules, so called luciferins, are named luciferases. A sovereign place between luciferases has NanoLuc, a small but high-performance luciferase of which we for now do not know how it produces its blue light. Another limitation is its synthetic luciferin, so called furimazine, which has shown cytotoxic effects, is poorly soluble and expensive. As a part of this thesis, the structure analysis of complexes of NanoLuc luciferase with oxidized forms of luciferins furimazine and native coelenterazine, bonded in the surface allosteric capsule, was made. However, the suppositional active site is located in the centre of molecule, therefore I made luciferase variants with substitutions in allosteric site, so we could establish, how is this allosteric site functionally important. Measurement of their activity showed significant increase in reaction with coelenterazine, while an activity in reaction with furimazine was not significantly affected. Afterwards, I made the crystallographic analysis of complex of non-oxidizable luciferin analogue, so called azacoelenterazine, with the brightest luciferase variant called NanoLuc^{CTZ}. The molecular structure confirmed that the catalytic site of this luciferase is located in the centre of β -barrel. The knowledge of atomic structures enabled to propose the catalytic mechanism of bioluminescent reaction and then the mechanism of homotropic negative allostery of NanoLuc luciferase.

Keywords

bioluminescence, luciferase, NanoLuc, crystallographic analysis, coelenterazine, furimazine, NanoLuc^{CTZ}

Obsah

1.	Úvod	7
2.	Cíle práce	8
3.	Teoretický úvod	9
3.1	Bioluminiscence – produkce a emise světla živými organismy	9
3.2	Luciferázy –enzymy katalyzující produkci světla	9
3.2	Historie vývoje luciferázy NanoLuc	11
3.2.1	Luciferáza OLuc má kvarterní strukturu a je špatně rozpustná	12
3.2.2	Počáteční inženýrství luciferázy NanoLuc	12
3.2.3	Molekulární vlastnosti luciferázy NanoLuc	14
3.2.4	Praktické aplikace luciferázy NanoLuc	14
4.	Metodika	15
4.1	Molekulární klonování a příprava rekombinantních proteinů	15
4.1.1	Cílená mutageneze	15
4.1.2	Rekombinantní produkce enzymu	18
4.1.3	Chromatografické purifikace proteinů	18
4.2	Analýza vlastností luciferázových variant	19
4.2.1	Měření specifické aktivity enzymů	19
4.2.2	Stanovení kinetických konstant luciferázové reakce	20
4.2.3	Fluorimetrická analýza stability proteinů	21
4.2.4	Spektroluminometrická analýza proteinů	21
4.2.5	Krystalografická analýza luciferázových variant	22
5.	Výsledky	24
5.1	Krystalografická analýza proteinu NanoLuc	24
5.2	Mapování luciferin-vazebného povrchového místa	29
5.3	Kinetická analýza luciferázových variant	31
5.4	Krystalografická analýza luciferinu v katalytickém místě	34
5.5	Návrh katalytického mechanismu luciferázy NanoLuc	36
6.	Diskuze	38
7.	Závěr	40
8.	Bibliografie	41
9.	Seznam obrázků a tabulek	45

1. ÚVOD

Bioluminiscence je fenomén, který fascinuje člověka již od pravěku. Kromě toho se vyznačuje také rostoucím významem v biochemických a biotechnologických laboratořích. Tuto emisi světla živými organismy lze použít nejen v biotechnologiích, ale i pro léčbu nádorů fotodynamickou terapií a pro praktické činnosti, jako třeba kontrola hygieny v nemocnicích či mapování znečištění v ekosystémech[1].

V roce 1978 profesor Shimomura popsal tento fenomén u hlubokomořské krevety *Oplophorus gracilirostris*, včetně luciferázového enzymu (OLuc), který katalyzuje bioluminiscenční oxidaci mořského luciferinu označovaného jako koelenterazin (CTZ). Produktem této biochemické reakce je oxidovaný luciferin označovaný jako koelenteramid (CEI), oxid uhličitý a foton viditelného modrého světla. Tato luciferáza se skládá ze dvou podjednotek, nazývaných dle své velikosti OLuc-35 a OLuc-19[2]. Bylo zjištěno, že bioluminiscenci katalyzuje pouze menší podjednotka OLuc-19, která je ovšem samostatně nestabilní a tedy nepoužitelná. Proto Mary Hall inženýrskými úpravami vytvořila z této podjednotky vysoce výkonnou a efektivní luciferázu NanoLuc a k ní komplementární luciferin furimazin[3]. Tato luciferáza byla jako jedna z nejmenších luciferáz aplikována v biotechnologiích nejen pro *in vitro* studie hepatitidy B a zimničky tropické, ale také se zvažuje jako základ pro reportér viru HIV[4].

Ačkoliv luciferáza NanoLuc dokáže katalyzovat oxidaci i svého původního luciferinu CTZ, její aktivita s komplementárním luciferinem FMZ je až 150krát vyšší než u jiných komerčně využívaných luciferáz, jako např. RLuc či FLuc[3]. I přesto je ale luciferin furimazin jednou z největších nevýhod pro biotechnologické aplikace, neboť je nejen velmi drahý či špatně rozpustný, ale také toxický pro *in vitro* i *in vivo* aplikace[5].

Atomární struktura luciferázy NanoLuc byla poprvé odhalena v roce 2016 a popsána jako monomerní enzym tvořený jedenácti antiparalelními β -skládanými listy, tvořící β -soudek obklopený čtyřmi α -šroubovice. Vzhledem k tomu, že enzym vykazuje podobnost k proteinům vázajícím vyšší mastné kyseliny (FABPs)[6] se předpokládá, že jeho katalytické místo se nachází uprostřed β -soudku. Jednotlivé struktury ukazující komplex luciferázy a luciferinu, které jsou klíčové pro popsání molekulární podstaty mechanismu bioluminiscenčních reakcí, pro luciferiny CTZ a FMZ, ale doposud chyběly.

V této práci je tedy popsána struktura komplexu luciferázy a luciferinu navázaného nejen v jejím katalytickém místě, ale také v nově objeveném povrchovém alosterickém místě, jež může mít velký význam pro pochopení mechanismu bioluminiscence organismu *Oplophorus gracilirostris*. Zároveň jsou v práci popsány rozdíly v enzym-substrátové specifitě mezi luciferiny FMZ a CTZ v kontextu luciferázy NanoLuc, což může být krok klíčový pro zdokonalení luciferázy NanoLuc v biotechnologických aplikacích.

2. CÍLE PRÁCE

Luciferáza NanoLuc je celosvětově známá jako zatím nejzářivější, a též jedna z nejmenších luciferáz, která má široký aplikační potenciál nejen v základním výzkumu, ale i v praktických biotechnologiích[4]. Avšak molekulární podstata jejího katalytického mechanismu je ale stále zatím neznámá[3, 6, 7], což je dáno hlavně nedostatkem informací o struktuře komplexu luciferáza-luciferin v průběhu katalýzy. Zároveň luciferáza NanoLuc vykazuje výraznou specifickou aktivitu se syntetickým luciferinem FMZ, i přesto, že původní luciferáza OLuc katalyzuje reakci s nativním luciferinem CTZ. Experimentálními cíli této práce tudíž bylo:

- Identifikovat a popsat katalytické místo luciferázy NanoLuc s navázaným luciferinem, pomocí rentgenové krystalografické strukturní analýzy.
- Vyřešit a popsat makromolekulární strukturu komplexu luciferázy NanoLuc jak s navázaným luciferinem FMZ, tak i s navázaným CTZ a popsat molekulární rozdíly v jejich rozpoznávání touto luciferázou.
- Ze získaných strukturních a biochemických dat navrhnout a zkonstruovat nové, vylepšené varianty enzymu, které by efektivně katalyzovaly bioluminiscenční reakci s nativním luciferinem CTZ, tak aby se nemusel používat syntetický, cytotoxický a drahý luciferin FMZ.

Pro splnění těchto hlavních cílů byly vždy navrženy jednotlivé dílčí cíle či úkoly, které vedly k identifikaci a popisu katalytického místa NanoLuc luciferázy. Mezi ně patřilo např. nalezení optimálních krystalizačních podmínek pro jednotlivé komplexy, vytvoření luciferázových variant s jednobodovými či vícebodovými substitucemi v klíčových aminokyselinách pomocí cílené mutagenese, měření jejich luciferázových aktivit, kinetických konstant a emisních spekter pro popsání vlivu jednotlivých aminokyselin na celý komplex.

3. TEORETICKÝ ÚVOD

3.1 Bioluminiscence – produkce a emise světla živými organismy

Bioluminiscence je vyzařování světla pomocí chemické reakce živým organismem. První zmínky o ní sahají až do roku 350 před naším letopočtem[8]. V mladší historii je poprvé zmíněna v souvislosti s Charlesem Darwinem a jeho účastí na druhé expedici HMS Beagle[9]. Chemická podstata vlastní reakce byla objevena a zkoumána až v 80. letech 19. století Raphaellem DuBois[10] a její klíčový okamžik pro vědu nastal v 40. letech 20. století, kdy Dr. Green a Dr. McElroy poprvé izolovali luciferázu světlušek[11].

V přírodě je bioluminiscence výhodnou schopností pro velkou řadu organismů. Dá se využívat nejen jako obrana, tedy odrazení predátora či odlákání jeho pozornosti (*Octopotheutis deletron*[12]), ale také právě naopak pro dezorientaci kořisti, nebo jako návnada (*Pyrophorus nyctophanus*[13]). Dalším využitím je např. vnitrodruhová komunikace, kamufláž či lákání organismů, jež šíří bioluminiscenční bakterie jejich pozřením. Také není výjimkou, že bioluminiscence má pro organismus více funkcí, jako je tomu např. u mořské bakterie *Vibrio harveyi*[14].

Kromě toho je bioluminiscence jedním z nejvíce fascinujících vědeckých fenoménů s ohromným aplikačním potenciálem. Jedním z důvodů je vysoká efektivita produkce světla bioluminiscenčními systémy. To znamená, že na výrobu tepla je spotřebováno minimální množství energie (cca 4 %[15]). Nejen proto se může bioluminiscence použít pro biotechnologické aplikace (např. monitoring pH, sledování koncentrace kovových iontů, reaktivních forem kyslíku, enzymů, molekul léčiv a membránových potenciálů i během *in cellulo* *in vivo* aplikací), pro léčbu nádorů fotodynamickou terapií, ale i pro praktické činnosti, jako třeba kontrola hygieny v nemocnicích či mapování znečištění v ekosystémech[1].

Molekulárním principem bioluminiscence je oxidace substrátu (tzv. luciferinu) molekulárním kyslíkem za přítomnosti enzymu zvaného luciferáza, který tuto reakci specificky katalyzuje. Přeměnou luciferinu vzniká tzv. oxyluciferin v elektronově excitovaném stavu, který poté samovolně přechází do základního stavu, což je doprovázeno emisí fotonu viditelného světla. Některé organismy vyvinuly recyklační systémy, které dokážou produkt recyklovat zpět do formy luciferinu[16]. Kromě katalýzy samotným enzymem je často také nutné dodat kofaktor reakce, např. kovový iont, ATP či peroxid vodíku[17].

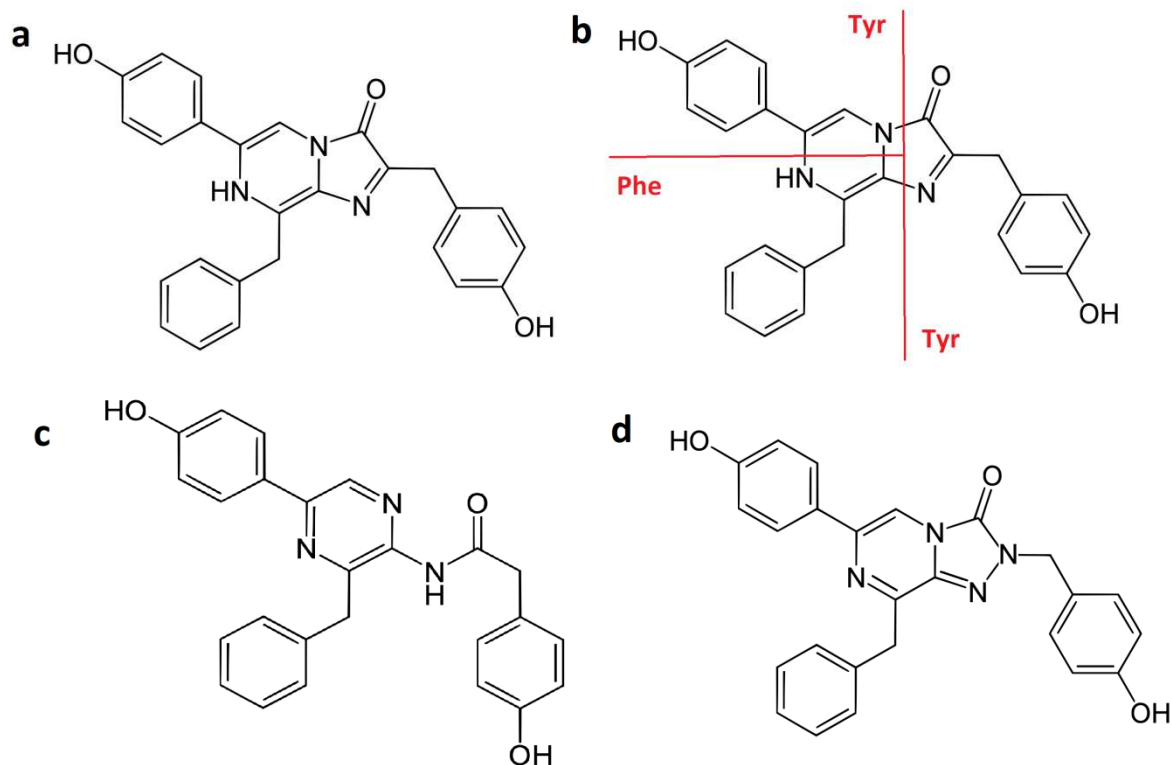
3.2 Luciferázy – enzymy katalyzující produkci světla

Proteiny produkující světlo můžeme dle molekulárního principu jejich reakce rozdělit do tří skupin: fluorescenční proteiny, fotoproteiny a luciferázy. Zatímco luciferázy jsou enzymy v pravém slova smyslu, které emitují světlo za přítomnosti molekulárního kyslíku ihned po přidání substrátu (luciferinu), zbylé dvě skupiny vždy vyžadují přijetí aktivačního signálu. Tím je pro fluorescenční proteiny excitační energie, pro fotoproteiny pak např. vyplavení

Ca^{2+} . Po obdržení tohoto aktivačního signálu následuje změna konformace proteinu, která vede k produkci fotonu[18, 19].

„Luciferáza“ je obecné označení velkého množství různých enzymů, jež katalyzují reakce produkující světlo. Zajímavostí je, že tyto enzymy často nemají podobné sekvence či strukturní vlastnosti[20]. Substrát, který je v této reakci katalyzován, nazývaný luciferin, je ale na rozdíl od luciferáz často pro různé skupiny organismů stejný[21].

V mořském prostředí je nejtýpčtějším substrátem tzv. koelenterazin (CTZ), (Obr.1). Ten je využíván v bioluminiscenčních reakcích různých i taxonomicky vzdálených druhů. Mezi ně patří např. *Renilla reniformis*[22], *Periphylla periphylla*[23], *Conchoecia pseudodicospora*[24]nebo *Vampyroteuthis infernalis*[25]. Ačkoliv biosyntetická dráha tohoto luciferinu není objasněna, pravděpodobně se jedná o derivát dvou molekul L-tyrosinu a jedné molekuly L-fenylalaninu. Syntézu takové molekuly by mohly zajišťovat např. neribozomální peptidové syntetázy, což ovšem prozatím nikdo experimentálně neprokázal [26], (Obr.1). Jak vyplývá ze systematického názvu koelenterazinu 6-(4-hydroxyfenyl)-2-[(4-hydroxyfenyl)methyl]-8-(fenylmethyl)-7H-imidazo[1,2-a]pyrazin-3-on, jeho molekula se skládá z imidazopyrazinonového heterocyklického jádra, které je klíčové pro oxidaci tohoto luciferinu, na jehož 2., 6. a 8. uhlíku jsou navázány arylové substituenty, jež zajišťují správné umístění luciferinu v enzym-substrátovém komplexu. Molekula koelenterazinu se samovolně oxiduje na tzv. koelenteramid (CEI), (Obr.1) nebo tzv. koelenteramin. Organismy této oxidaci zabraňují vazbou koelenterazinu na speciální koelenterazin-vazebný protein, anebo jeho chemickou derivatizací zabraňující samovolné oxidaci[27]. V laboratorním prostředí byl tento problém řešen pomocí stabilního analogu koelenterazinu, tzv. azakoelenterazinu (azaCTZ), (Obr.1), jehož uhlík C2, klíčový pro oxidaci, je nahrazen dusíkem[28]. Díky této změně je analog při běžné reakci luciferázy neoxidovatelný, ovšem strukturní vlastnosti klíčové pro vazbu luciferinu do aktivního místa luciferázy jsou nezměněny[28].



Obr. 1 Struktura (a) molekuly koelenterazinu a (b) schéma jeho pravděpodobné biosyntézy z tripeptidu tyrosin-tyrosin-fenylalanin[26](ve struktuře je červenou barvou znázorněn pravděpodobný původ dané části molekuly), (c) molekuly koelenteramidu a (d) molekuly azakoelenterazinu[28].

3.2 Historie vývoje luciferázy NanoLuc

Pro biotechnologické aplikace je kromě jiných široce využívána luciferáza NanoLuc[3]. Jedná se o inženýrsky upravenou luciferázu bioluminiscenčního organismu *Ophlophorus gracilirostris*, zvanou OLuc, komerčně dodávaný firmou Promega Corporation (USA).

Počátek vývoje a vzniku vysoce výkonné luciferázy NanoLuc sahá k hlubokomořské krevetě *Ophlophorus gracilirostris*. Ta dokáže při ohrožení predátorem provést oxidaci substrátu CTZ na CEI, zatímco obě tyto látky vypustí do prostředí kolem sebe. Zajímavostí je, že tato reakce probíhá, když kreveta „vyplivne“ do vody okolo sebe sekret, obsahující jak luciferázu (OLuc), tak i její substrát CTZ. Sekret emitující modré světlo dokáže oslepit predátora na takovou dobu, aby se ohrožená kreveta stačila vzdálit do bezpečí.



Obr. 2 *Ophlophorus gracilirostris* (Převzato z Wikimedia Commons)

3.2.1 Luciferáza OLuc má kvarterní strukturu a je špatně rozpustná

Právě protein OLuc byl základem pro vytvoření vysoce výkonné a elegantní luciferázy NanoLuc. Přírozený protein OLuc je 106 kDa velký protein s vysokou selektivitou a stabilitou. Nicméně je tohomodimer, kde se každý monomer skládá ze dvou různých domén, první o velikosti ~ 35 kDa a druhou o velikosti ~ 19 kDa. Klíčovou částí pro bioluminiscenční reakci se ale ukázala být pouze druhá z těchto částí, někdy nazývaná též jako OLuc-19. Větší 35kDa podjednotka plní funkci ochrannou. Pravděpodobně zajišťuje správné sbalování katalytické části, což dokazuje například i podobnost s vnitrobuněčnými proteiny vázajícími lipidy (intracellular lipid binding proteins - iLBPs)[6]. Též je možné se domnívat, že tato podjednotka může být zodpovědná za skladování molekul luciferinu.

Posléze se ovšem ukázalo, že izolovaná podjednotka OLuc-19 není vhodná pro další biotechnologické použití, neboť je nestabilní, nevykazuje kladné vlastnosti nativního proteinu a její exprese má malý výtěžek z důvodu její nízké rozpustnosti. Proto firma Promega řízenou evolucí a mutagenezí vytvořila nový modifikovaný protein označovaný jako NanoLuc (někdy též zkráceně NLuc), jež je optimalizovaný pro praktické aplikace v biotechnologiích a biomedicíně[3].

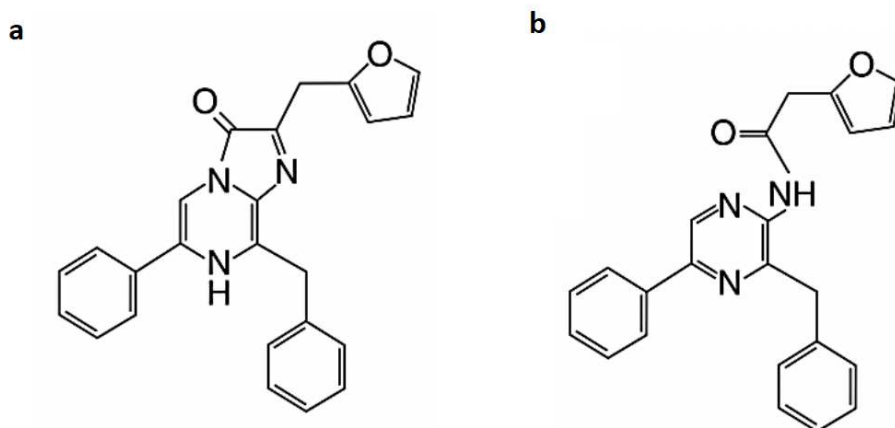
3.2.2 Počáteční inženýrství luciferázy NanoLuc

Prvním krokem ke zvýšení stability OLuc-19 bylo nahrazení asparaginu za arginin v pozici 166 (mutace N166R). Tato mutace byla zvolena na základě dříve zmíněné podobnosti s iLBP

proteiny. V těch je v tomto místě vodíkový můstek mezi krajními částmi proteinu, který přispívá k vyšší stabilitě proteinového lešení. Tento vodíkový můstek v OLuc-19 chybí, protože namísto argininu (či lysinu), který patří mezi aminokyseliny vytvářející vodíkový můstek, je zde asparagin N166. Mutací asparaginu na arginin je tedy zajištěno zvýšení stability (až o 50%) a intenzity světla při bioluminiscenci (až třikrát).

Další optimalizace OLuc-19 za účelem intenzivnější bioluminiscence byla provedena ve třech fázích. První fáze byla náhodná mutagenese a následné hledání nejlépe svítících mutantů. Relativní hodnotu větší než jedna měly mutace A4E, Q11R, A33K, V44I, A54F, P115E, Q124K, a Y138I. Ty byly zkombinovány do varianty tzv. C1A4E, která produkovala 29 000-krát intenzivnější signál než OLuc-19_N166R a též byla výrazně stabilnější[3].

Druhá fáze se snažila o nalezení nejvhodnějšího substrátu, který nejen že má zvyšovat intenzitu bioluminiscence, ale též získat co největší stabilitu a co nejnižší spontánní chemiluminiscenci. K tomu bylo využito a syntetizováno jedenáct analogů koelenterazinu, které byly kombinovány s luciferázou C1A4E. Ke stabilizaci a navýšení intenzity svícení přispěly mutace Q18L, F54I, F68Y, L72Q, M75K, a I90V. Nalezený substrát, který nejvíce splňoval stanovená kritéria, byl 2- furyl-methyl-deoxy-koelenterazin neboli furimazin (FMZ).



Obr. 3 Struktura molekuly (a) furimazin (FMZ) a (b) jeho oxidované formy furimamid (FMA).

Třetí fáze se tedy soustředila na zvýšení intenzity bioluminiscence s tímto nejefektivnějším substrátem – FMZ. Šlo o další náhodné mutace, z nichž mutace L27V, K33N, K43R, a Y68D vedly k dalšímu zvýšení intenzity bioluminiscence.

Kombinace 16 substitucí vytvořených téměř náhodně v daných třech fázích mutagenese tedy dohromady dávají dohromady vysoce výkonnou luciferázu, která je pojmenovaná jako NanoLuc (či NLuc)[3].

3.2.3 Molekulární vlastnosti luciferázy NanoLuc

NanoLuc je tedy pouze 19 kDa velký protein, což je jedna z jeho nejvýhodnějších vlastností pro praktická využití. Další z těchto vlastností je jeho vysoká relativní aktivita. Ta je zhruba 150-krát vyšší než u jiných využívaných luciferáz, např. *Renilla* luciferáza (RLuc), což může být dáno vyšší hodnotou rychlostní konstanty katalyzované reakce (k_{cat}). Emisní maximum luciferázy NanoLuc nastává přibližně při 460 nm, stejně tak jako v případě původního proteinu OLuc. Oproti jiným komerčně využívaným luciferázám je ale jeho emisní spektrum posunuto do nižších hodnot (RLuc/CTZ (480 nm), FLuc/D-luciferin (565 nm) a CBR/D-luciferin (605 nm)).

Další klíčovou vlastností luciferázy NanoLuc je stabilita, a to při širokém spektru podmínek. Například v případě teplotní stability se aktivita enzymu snižuje až po 55°C, zatímco u jiných (FLuc) je to už kolem 30°C. V případě pH jsou ideální podmínky pro NanoLuc v rozmezí od pH=7 až do pH=9, na rozdíl od FLuc, jehož aktivita klesá již při pH=8. NanoLuc má také delší účinnost a zvýšenou aktivitu v prostředí s vysokou koncentrací močoviny či chloridu sodného, kde jeho aktivita klesá až při $c = 10 \text{ M}$ [3].

3.2.4 Praktické aplikace luciferázy NanoLuc

Díky výše zmíněným výhodným vlastnostem je NanoLuc oblíbený v laboratorních aplikacích. Použit se dá např. pro monitoring interakcí protein-protein či protein-ligand, kde se vyzdvihuje jeho levná a rychlá příprava, větší bezpečnost, delší životnost a vyšší senzitivita než u klasicky používaných monitorovacích metod, založených třeba na radioaktivitě. V této oblasti byl také NanoLuc využíván pro *in vitro* studie viru hepatitidy B či parazita zimničky tropické (*Plasmodium falciparum*) a uvažuje se o využití NanoLuc luciferázy jako základu pro reportér viru HIV. Dalším využitím je sledování exprese genů, kde jsou klíčovými vlastnostmi malá velikost luciferázy a fakt, že nepotřebuje žádné posttranslační modifikace, sledování stability jiných proteinů, kde je potenciální využití při vývoji léku pro Alzheimerovu chorobu, či využití BRET (rezonanční přenos bioluminiscenční energie) senzorech, které s využitím NanoLuc enzymu sledují interakce biologických makromolekul [4].

4. METODIKA

4.1 Molekulární klonování a příprava rekombinantních proteinů

4.1.1 Cílená mutageneze

Prvním krokem produkce mutovaného proteinu byla mutageneze deoxyribonukleové kyseliny (DNA) původního genu kódujícího luciferázu NanoLuc. Pro tento účel byl zvolen protokol mutageneze DNA na základě tzv. MegaPrimeru. Tato metoda spočívá ve využití polymerázové řetězové reakce (PCR) pro inkorporaci požadovaných mutací do templátové DNA.

PCR je jedna z nejznámějších metod molekulární biologie. Funguje na základě opakování tří změn teplot v okolí, kde při 98 °C dochází k denaturaci templátové DNA, následně při 55 °C nasedá na jednovláknovou DNA primer (v našem případě nositel mutace) a při 72 °C dochází k syntéze komplementárního vlákna DNA. Složení reakční směsi a teploty PCR protokolu jsou uvedeny v tabulkách 4 a 5.

Tab. 1 Složky 1. PCR.

Komponent reakce	Koncentrace	Objem
Deionizovaná voda	-	33,5 µl*
Reakční pufr	5krát koncentrovaný roztok	10 µl
Nukleotidy	10 mM každý (A,T,G,C)	1 µl
Fw primer	10 µM	2 µl*
Rv primer	10 µM	2 µl*
templát DNA (gen NLuc)	100 ng/µl	1 µl*
polymeráza Phusion	2000 U/ml	0,5 µl*
celkový objem	-	50 µl

*Objem těchto komponent se může vychýlit v jednotkách mikrolitrů pro větší úspěšnost celkové mutageneze, celkový objem však musí vždy zůstat 50 µl.

Tab. 2 Průběh PCR

Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
98	30	1
98	10	30
55	20	30

72	30	30
72	120	1

Takto se syntetizuje MegaPrimer, jež je poté smíchán s 10 µl Purple loading dye a 35 minut separován od nečistot či částečně amplifikovaných DNA fragmentů pomocí agarózové elektroforézy. To je molekulární metoda, v níž jsou látky separovány na základě prostupnosti elektrickým polem, které je v tomto případě tvořeno napětím 120 V a proudem 400 mA.

Poté je proužek gelu obsahující syntetizovaný MegaPrimer požadované délky vyříznut skalpelem. MegaPrimer je z gelu extrahován pomocí reakční soupravy NucleoSpin Gel (Macherey-Nagel, Německo) dle protokolu výrobce. Následně je měřena koncentrace MegaPrimeru pomocí spektrofotometru.

Následně je obdobná PCR prováděna podruhé, ovšem s tím rozdílem, že místo primerů je zde použit 1 µl MegaPrimeru vyrobeného v předchozí reakci, s koncentrací přibližně 100 ng/µl (objem se může měnit na základě koncentrací). Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 6. Samotná PCR probíhá stejně. Tím nám vzniká kompletní nově syntetizovaná sekvence plasmidového vektoru nesoucí gen s požadovanou mutací.

Tab. 3 Složky 2. PCR.

Komponent reakce	Koncentrace	Objem
MilliQ voda	-	17,75 µl*
Reakční pufr	5krát koncentrovaný roztok	5µl
Nukleotidy	10 mM každý (A,T,G,C)	0,5µl
MegaPrimer DNA	10 µM	1 µl*
templát DNA (gen NLuc)	100 ng/µl	0,5 µl*
polymeráza Phusion	2000 U/ml	0,25 µl*
celkový objem	-	25µl

*Objem těchto komponentů se může vychýlit v jednotkách mikrolitrů pro větší úspěšnost celkové mutagenéze, celkový objem však musí vždy zůstat na 50 µl.

Následně jsou špatně zmutované či nezmutované úseky DNA odstraněny pomocí enzymu DpnI, který selektivně štěpí methylovanou templátovou DNA, zatímco nově *in vitro* syntetizovaná DNA štěpena není a zůstává v roztoku intaktní. Pokud tedy na náš původní primer přidáme methylovou skupinu, vyselektujeme správnou DNA s naší konkrétní substitucí.

Takto zhotovený plasmid transformujeme pomocí teplotního šoku do bakteriálních buněk *Escherichia coli* DH5 α . Je nutné, aby tento plasmid kromě našeho genu nesl také gen pro resistenci vůči antibiotiku ampicilinu. Toto antibiotikum je přidáno (100 μ g/ml) do LB media zpevněného agarem v Petriho misce, na které množíme bakterie po transformaci. Po dobu 12 hodin se ve 37 °C vytvářejí kolonie pouze těch bakterií, jež jsou resistantní vůči antibiotickému prostředí, a tedy nesou plasmid s naším genem.

Následně jsou jednotlivé kolonie rozmnoženy v 10 ml LB media, nutričně bohaté živné směsi speciálně upravené pro kultivaci bakterií *Escherichia coli*, ošetřené ampicilinem (100 μ g/ml). Složky LB media jsou zapsány v tabulce A. Ošetření ampicilinem se provádí pro separaci smíchaných zmutovaných kolonií a náhodné nezmutovaných kolonií.

Po tomto kroku jsou plasmidy izolovány z buněk pomocí reakční soupravy NucleoSpin plasmid dle protokolu výrobce, poté je změřena jejich koncentrace pomocí spektrofotometru a plasmidy jsou sekvenovány firmou Eurofins Genomics. Touto kontrolou mutagenese končí. V našem případě bylo touto metodou vytvořeno 19 mutací, jejichž seznam je v následující tabulce. Primery byly vytvořeny synteticky firmou Sigma Aldrich.

Tab. 4 Seznam vytvořených mutantů luciferázy NanoLuc

Mutant	Templát	Primer (Fw;Rv)
D9R	wild type	D9R; pET
H57A	wild type	H57A; pET
K89R	wild type	pET; K89R
D9R+H57A	H57A	D9R; pET
D9R+K89R	D9R	pET; K89R
H57A+K89R	H57A	pET; K89R
D9R+H57A+K89R	D9R+H57A	pET; K89R
R11E	wild type	R11E; pET
D55A	wild type	D55A; pET
R166A	wild type	pET; R166A
K89E	wild type	pET; K89E
R43A	wild type	R43A; pET
H57Y	wild type	H57Y; pET
K89A	wild type	pET; K89A

Y81A	wild type	pET; Y81A
R166Q	wild type	pET; R166Q
del I167-A169	wild type	pET; del 167-A169
ext A170-A171	wild type	pET; ext A170-A171
Y94A	wild type	pET; Y94A

4.1.2 Rekombinantní produkce enzymu

Pro rekombinantní produkci proteinu je nutné izolovaný DNA plasmid pomocí transformace teplotním šokem přenést do bakteriálních expresních buněk *E. coli* BL21(DE3). Jejich jednotlivé kolonie jsou poté kultivovány na LB-agaru s ampicilinem (100 µg/ml) pro zabránění růstu jiných netransformovaných bakterií. Jednotlivé vybrané kolonie jsou následně kultivovány v tekutém 2xLB médiu s přidavkem ampicilinu (100 µg/ml) po dobu 5 hodin ve 37 °C za stálého míchání (150 otáček/min).

Následná exprese byla navozena přidavkem induktoru IPTG ve finální koncentraci 0,5 mM. Jedná se o analog tzv. allolaktózy, což je sacharid, jenž se váže na represor tzv. *lac* operonu, čímž umožňuje jeho translaci. Právě proto i jeho analog zabraňuje tomuto represoru, aby se vázal na námi chtěný úsek DNA (*lac* operon) a indukoval tak translaci a produkci požadovaného proteinu.

Takto připravené buňky byly přes noc kultivovány ve 20 °C za stálého míchání (150 otáček/min), následně sklizeny pomocí centrifugy (15 minut, 4000 g, 4°C) a zamrazeny při -80 °C pro další použití.

Pro purifikaci byl samotný protein připraven bezprostředně před ní a všechny kroky byly provedeny na ledu, aby se zamezilo degradaci samotného proteinu. Nejdříve byl pelet z předchozí centrifugace rozpuštěn v pufru s vysokou koncentrací soli (10 mM roztok Tris, 400 mM roztok NaCl, pH = 7,5) s DNázou (20 µg/ml), která štěpí bakteriální DNA, aby náš produkt zůstal čistý. Jednotlivé buňky byly poté rozbity kavitací ultrazvukem a zbylé části buněk byly odstraněny centrifugací (50 min, 21 000 g, 4°C) a filtrací.

4.1.3 Chromatografické purifikace proteinů

Poté, co je protein oddělen centrifugací od zbylých částí buňky, je nutné jej separovat od zbylých proteinů a jiných buněčných komponent. Tento krok se provádí pomocí dvou různých typů chromatografie: afinitní chromatografie a permeační gelové chromatografie (Gel filtration chromatography - GFC).

Konkrétní metodou afinitní chromatografie je použití tzv. histidinové kotvy. Jde o šest aminokyselin – histidinů, které jsou součástí produkovaného proteinu. Takto připravený

protein je separován přes afinitní kolonu, kde jsou na stacionární fázi imobilizovány dvoumocné kationty niklu, kobaltu apod., na kterých se protein právě díky histidinové kotvě zachytí. Tímto se protein oddělí od nečistot a následně je vyvážen z kolony pomocí nadbytku imidazolu, jenž kompetuje s histidinovou kotvou o vazbu s dvoumocnými kationty. Při tomto vyvazování je také pomocí UV záření sledováno, ve kterou chvíli je protein vyplaven z kolony a ve kterých frakcích se nachází.

Před afinitní chromatografií je protein uchováván na ledu v pufru s vysokou koncentrací soli. V našem případě to byl purifikační roztok A se složením: 10 mM roztok Tris a 400 mM roztok NaCl; pH = 7,5 (5 mM imidazol). Při samotné chromatografii je protein promýván pufrům s nižší koncentrací soli (10 mM roztok Tris a 50 mM roztok NaCl; pH = 7,5). Toto promytí zajistí postupný přechod proteinu do prostředí s nižší koncentrací soli a plní tím funkci dialýzy. Následně je protein vymýván z kobaltové 5ml afinitní kolony pufrům s vysokým obsahem imidazolu (10 mM roztok Tris, 50 mM roztok NaCl, 250 mM roztok imidazolu; pH = 7,5).

Následně jsem proteiny přečistila na tzv. permeační gelové chromatografii (GPC). Jde o krok, který zajišťuje, aby se z finálního produktu dostaly různé nežádoucí příměsi (např. imidazol) či kontaminující proteiny, obsahující více histidinů za sebou, které se společně s proteinem zájmu, avšak nespécificky naváží na kolonu afinitní chromatografie. SEC je separační metoda, která dělí látky na základě velikosti a tvaru molekul. Je tvořena tuhým gelem s malými póry, do kterých mohou zapadnout molekuly menší velikosti. Velké molekuly tedy projdou kolonou rychle a ty malé, zpomalené procházením jednotlivých pórů, až později, čehož se velmi efektivně využívá k separaci makromolekul. Luciferázové varianty byly purifikovány na koloně HiLoadTM 16/600 SuperdexTM 200 pg, a to do pufru s nízkou koncentrací soli (10 mM Tris a 50 mM NaCl; pH = 7,5). Takto připravené proteiny byly po 100 µl zmrazeny pomocí tekutého dusíku a uchovávány v -80°C.

4.2 Analýza vlastností luciferázových variant

Všechna kinetická měření probíhala ve 100 mM draselno-fosfátovém pufru, složeného z 82 mM K₂HPO₄ a 18 mM KH₂PO₄. Jeho pH bylo dorovnáno na hodnotu 7,5 pomocí H₃PO₄ a KOH. Zásobní roztok CTZ byl vytvořen z 1 mg CTZ (M_r = 423,46; Carl Roth, Německo) rozpuštěním v 3 ml ethanolu. Příprava probíhala na ledu v lahvičce z hnědého skla, která byla následně uzavřena víčkem se septem a zapečetěna. Vzduch v lahvičce byl vyměněn za dusík. Před každým měřením byla spektrofotometricky stanovena koncentrace daného roztoku.

4.2.1 Měření specifické aktivity enzymů

Specifická aktivita byla měřena pomocí přístroje FLUOstar Omega. Jedná se o multifunkční čtečku mikrotitračních destiček, jež v případě luminiscence převádí světlo emitované při oxidaci luciferinu na oxyluciferin na elektrický signál pomocí fotonásobiče (anglicky též photomultiplier tube, zkráceně PMT), který využívá lineární závislosti mezi intenzitou světla a elektrickým signálem. Na rozdíl od fluorescence se jedná o reakci, při níž se emituje světlo, a tak při tomto měření není potřeba žádný světelný zdroj a excitační filtr, jež při detekci

fluorescence zajistí excitaci elektronů a tedy emisi. Při našem měření bylo k 25 μl enzymu po uplynutí 10 s (určených pro sběr základní linie) injektováno 225 μl substrátu o koncentraci 2,2 μM . Koncentrace substrátu byla zvolena tak, aby vždy byla alespoň 5-krát vyšší než koncentrace enzymu. Konečná koncentrace enzymu byla mezi 0,3 – 320 nM, pro každý enzym byla zvolena tak, aby se intenzita luminiscence nelišila během měření (ihned po injektáži a 15 s po injektáži) více než o 2 %. Měření probíhala v triplikátu po dobu 15 s pro vlnové délky 240 – 720 nm. Aktivita, naměřená v jednotkách RLU (relative luminescence units), byla poté vztažena na koncentraci enzymu. Výsledná aktivita byla stanovena v jednotkách $\text{RLU}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$.

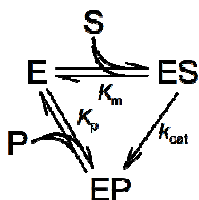
4.2.2 Stanovení kinetických konstant luciferázové reakce

Pro měření kinetických vlastností reakce substrátu a enzymu byl využit přístroj FLUOstar Omega. Ten dokáže detekovat změny ve vzorku (tedy daný průběh reakce) pomocí změny světla emitovaného vzorkem. Na rozdíl od fluorescence je v našem případě toto světlo samotný produkt luciferázové reakce, proto není nutné použití zdroje světla. Měření probíhalo vždy od začátku reakce automatickým vstříknutím 225 μl substrátu k 25 μl enzymu v jamkách destičky tak dlouho, dokud intenzita luminiscence neklesla pod 0,5 % svého maxima nebo dosažení času 1000 s. Koncentrace luciferinu byla zvolena tak, aby jeho hodnoty co nejlépe proložily křivku závislosti koncentrace substrátu na rychlosti reakce, čehož bylo docíleno nejdříve odhadem konstanty K_m na základě jejího vztahu s limitní rychlostí reakce. Konkrétní koncentrace při jednotlivých měřeních jsou uvedeny v tabulce 5. Dle těchto hodnot byla poté zvolena koncentrace enzymu, tak aby byla alespoň 5-krát menší než nejnižší hodnota koncentrace substrátu, a citlivost přístroje, tak aby byla spolehlivě zaznamenána i nejvyšší hodnota luminiscence. Detekce probíhala v 1s intervalech pro vlnové délky 240 nm – 720 nm.

Tab. 5 Koncentrace luciferinů FMZ a CTZ pro rovnoměrné proložení křivky grafu závislosti rychlosti reakce na koncentraci substrátu.

Číslo měření	Koncentrace FMZ (μM)	Koncentrace CTZ (μM)
1.	-	4,4
2.	2,2	2,2
3.	1,1	1,1
4.	0,55	0,55
5.	0,28	0,28
6.	0,14	0,14
7.	0,07	-

Kinetické konstanty luciferázové reakce jsou popsány schématem (obrázek 4), kde volný enzym (E) reaguje s volným substrátem (S) za vzniku komplexu enzym-substrát (ES). Tuto reakci, a tedy i vazbu mezi enzymem a substrátem, popisuje Michaelisova konstanta K_m , jež je shodná s poměrem kinetických konstant k_1 a k_{-1} . Následně se v rámci komplexu s enzymem substrát oxiduje a emituje světlo, čímž tvoří komplex enzym-produkt (EP). Tento klíčový proces popisuje kinetická rychlostní konstanta k_{cat} . Komplex enzym-produkt se následně rozpadá zpět na volný enzym (E) a volný produkt (P). Tento děj popisuje rovnovážná konstanta K_p . K získání jednotlivých kinetických konstant byl využit program KinTek Explorer (KinTek Corporations, USA). Ten funguje na principu postupného dosazování různých hodnot proměnných, čímž hledá nejideálnější řešení kinetických rovnic pro dané schéma reakce, tak, aby výsledná rovnice odpovídala reálným naměřeným hodnotám s co nejmenší odchylkou. Kontrola byla provedena metodou analýzy kontur spolehlivosti programem FitSpace Explorer (KinTek Corporations, USA), který zkoumá vliv změny vždy jedné ze stanovovaných konstant na odchylku vůči reálným hodnotám, zatímco ostatní konstanty jsou zachovány.



Obr. 4. Schéma reakce pro kinetické rovnice. E znázorňuje volný enzym, P volný produkt a S volný substrát. ES poté znázorňuje komplex enzym-substrát a EP komplex enzym-produkt. Konstanta K_m popisuje vazbu mezi substrátem a enzymem. Konstanta k_{cat} popisuje rychlost přeměny substrátu na produkt v jejich komplexech. Konstanta K_p popisuje rozpad komplexu enzym-produkt.

4.2.3 Fluorimetrická analýza stability proteinů

Termostabilita neboli teplota, při které protein denaturuje, byla měřena pomocí přístroje Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies, Německo) metodou nanoDSF (nanodiferenční skenovací fluorimetrie). Ta spočívá ve změně fluorescence postranních řetězců tryptofanu a tyrosinu přítomných ve zkoumaném proteinu v závislosti na změně jejich prostředí (tedy agregaci proteinů). To znamená, že zatímco se v okolí proteinu mění teplota o 1 °C za minutu v rozmezí od 25 °C do 95 °C, zaznamenává se fluorescence zmíněných dvou aminokyselin, která je vyvolána excitací zářením o vlnové délce 280 nm, a zkoumá se poměr emise při 330 a 350 nm, jež se výrazně mění při denuraci jednotlivých vodíkových můstků. Změny fluorescence jsou pomocí polovodičového detektoru zaznamenávány do grafu, z jehož první derivace lze určit charakteristickou teplotu tání proteinu (T_m), což je teplota, při níž je agregována právě polovina množství měřeného proteinu.

4.2.4 Spektroluminometrická analýza proteinů

Luminiscenční emisní spektrum bylo stanoveno pomocí spektrofluorimetru FluoroMax Plus (HORIBA, Japonsko). Ten stanovuje intenzitu světla v závislosti na vlnové délce tak, že

jednotlivé vlnové délky odděluje monochromátorem. Tím dokáže přiřadit vlnovou délku k signálu, zaznamenaném na detektoru. Reakce probíhala na okně mikrokyvety (Hellma Traycell, $d = 1$ mm, Hellma Analytics), kde 10 μ l enzymu reagovalo s 1 μ l luciferinu (~500 μ M, v roztoku ethanolu). Měření probíhalo v intervalu po 0,5 nm v rozmezí od 350 nm do 600 nm. Šířka detekovaného pásma emise byla 5 nm a čas integrace 0,1 s. Konečná koncentrace enzymu byla zvolena buď 3 μ M, nebo 0,3 μ M dle časového rozpětí reakce a tak, aby bylo celé emisní spektrum zaznamenáno rovnoměrně.

4.2.5 Krystalografická analýza luciferázových variant

Pro vytvoření krystalů jednotlivých komplexů protein-substrát byl použit enzym v koncentraci 400 μ M (10 mg/ml). Té se dosáhlo centrifugací pomocí Centrifugal Filter Units Amicon R Ultra-15 Ultracel R-3K (Merck Millipore Ltd., Ireland), speciálních nádob s membránami obsahující póry, jež do druhé oddělené části nádoby postupně propouští pouze pufr pro skladování a jiné molekuly menší než cca 3 kDa, čímž koncentrují makromolekuly. Takto připravený enzym byl smíchán se substrátem (azaCTZ, azaFMZ, CTZ a FMZ; 2,0M), inkubován po dobu 60 minut a následně centrifugován (10 min, 12 000 g, 4°C). Ideální podmínky pro krystalizaci byly zjištěny pomocí 96-jamkových destiček, kde v každé jamce bylo smícháno vždy 1 nl připraveného enzymu a 1 či 2 nl roztoku udávajícího prostředí, pro každou jamku unikátní. V našem případě byly použity podmínky PACT, Midas, Index, SG1, Wizard, JSCG+, Morpheus a MemGold 2 (Molecular Dimensions, UK). Samotná krystalizace byla prováděna se stejně upraveným enzymem v Easy-Xtal 15 jamkových destičkách, kde byl smíchán 1 μ l roztoku enzymu s 1 μ l zásobního roztoku. Zde dochází k difúzi, jež je navozená smícháním roztoku enzymu se zásobním roztokem. Takto připravená směs se “pověsí”, tak, aby vytvořil kapku nad jamku, ve které je stejný zásobní roztok jako v kapce. Tím, že je ale roztok v kapce smíchán s roztokem enzymu, je méně koncentrovaný. Díky tomu, se z kapky vypařuje voda (aby se koncentrace zásobního roztoku v kapce a jamce vyrovnaly). Tím se ale pomalu zvyšuje i koncentrace enzymu v kapce a tvoří se krystal. V našem případě byl zvolen zásobní roztok následujícího složení: 100 mM octan amonný, 0,1 M Bis-Tris, pH 5,5 a 17% (w/v) PEG 10000. Poměr s roztokem enzymu byl 1:1 a zásobní roztok v jamce měl objem 500 μ l. Krystalizace probíhala v 18 °C po dobu 5-7 dní. Poté byly krystaly zmrazeny v zásobním roztoku s 20% glycerolu pomocí tekutého dusíku a uchovány pro zkoumání krystalů.

Pro určení samotné struktury daného enzymu byla použita rentgenová krystalografie, konkrétně Swiss Light Source (SLS) synchrotron. To je metoda založená na faktu, že při dopadu RTG záření jedné dané vlnové délky (což je zařízeno monochromátorem – v našem případě cca 1 Å) na daný krystal se toto záření rozptýlí dle struktury daného enzymu. Krystal se postupně otáčí a zaznamenávají se data ze všech stran mřížky. Intenzita a úhel odraženého paprsku se zaznamenávají pomocí detektoru, který z daných dat tvoří dvoudimenzionální obrázky. Ty jsou poté pomocí počítačového programu spojeny dohromady tak, aby vytvořily trojdimenzionální model (v našem případě byly použity pro zpracování a kompresi dat programy XDS a program Aimless) nejdříve mapy elektronových hustot a poté modelu samotného proteinu. Pro vytvoření dané mapy elektronových hustot je nutné znát tzv. počáteční fázi (G). Tu ovšem během experimentu

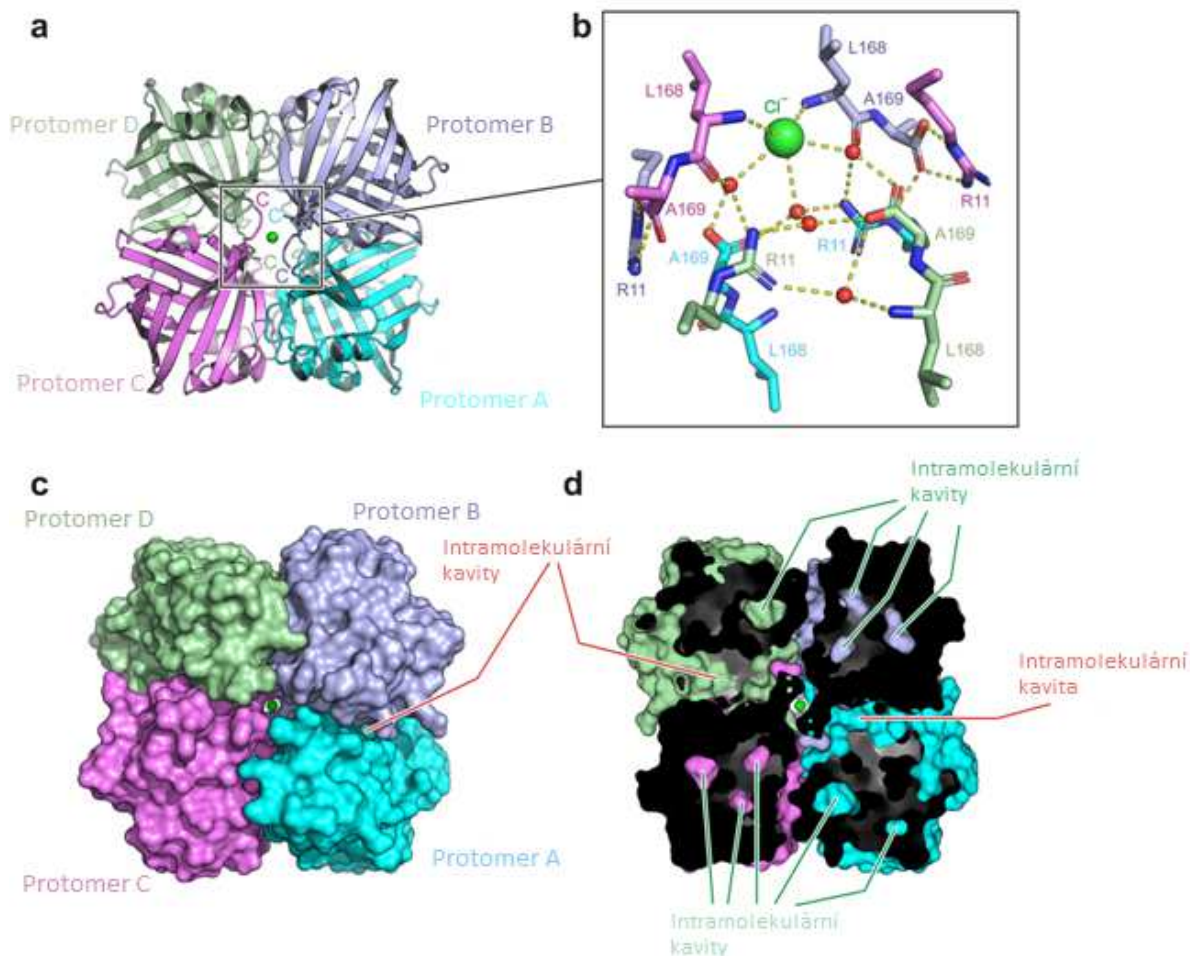
nemůžeme měřit (tzv. fázový problém). Ten byl v našem případě vyřešen molekulární náhradou (tedy použitím podobné molekuly pro účel získání potřebných dat a dopočítání dané mapy elektronové hustoty). Měření a řešení makromolekulárních struktur probíhalo pod odborným dozorem školitele této práce.

5. VÝSLEDKY

5.1 Krystalografická analýza proteinu NanoLuc

Znalost struktury NanoLuc luciferázy je klíčová pro pochopení katalýzy a produkce světla tímto enzymem. NanoLuc je tvořen ze 169 aminokyselin, uspořádaných do čtyř α -šroubovic a jedenácti antiparalelních β -skládaných listů[6]. Tyto listy spolu tvoří tzv. β -soudek. Aktivní místo pro katalýzu by se mělo nacházet ve středu molekuly. Jde o kapsu mezi α -šroubovicemi 2, 3, a 4 a jednou stranou β -soudku.

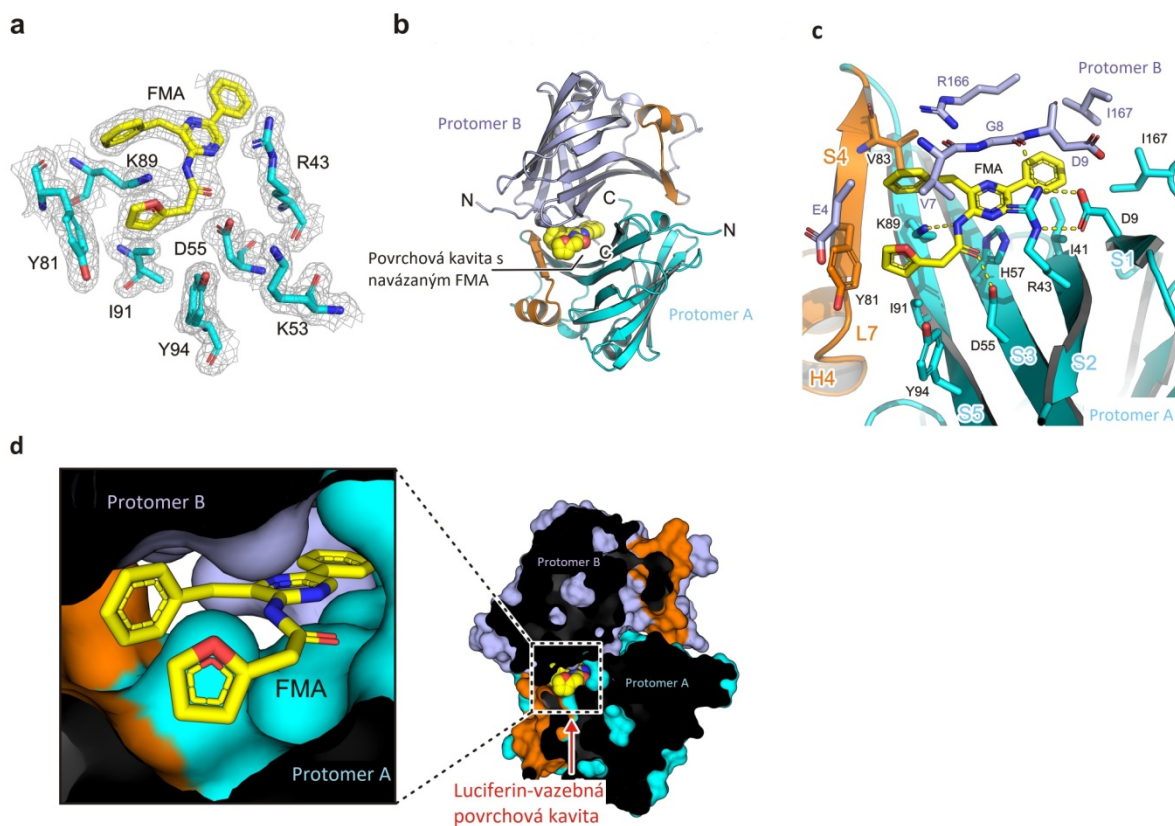
Krystalografické studie v naší laboratoři ovšem ukázaly, že luciferáza může tvořit velmi kompaktní homotetramer, tvořený dvěma symetrickými dimery a vyznačující se vnitřním pórem se všemi C-konci v jejím středu. Tato homotetramerní struktura ovšem tvoří nové mezimolekulární dutiny, které by též mohly sloužit pro vazbu luciferinu (Obr.4). Tento předpoklad se ověřil při našich experimentech, ve kterých jsme krystaly NanoLuc luciferázy namáčeli v krystalizačním pufu, který též obsahoval luciferin FMZ. Následná krystalografická analýza ukázala, že v tetrameru enzymu je přítomen oxidovaný produkt luciferinu, tzv. furimamid (FMA). Podrobná analýza tohoto enzym-luciferin komplexu ukázala, že vazba luciferinu lokálně narušuje symetrii homotetramerního uspořádání. Konkrétně jde o helix H4, smyčku L7 a β -skládaný list S4, které mění svojí konformaci po navázání luciferinu do mezimolekulární kavity. Tyto změny dělají právě onu kavitu na površích molekul enzymů, kam se váže molekula luciferinu.



Obr. 5 Homotetramerní struktura luciferázy NanoLuc. (a) Grafické zobrazení homotetramerní struktury luciferázy se všemi čtyřmi C-konci v jejím středu, obklopující chloridový iont Cl⁻. (b) Přibližný pohled na interakci mezi C-konci jednotlivých protomerů s chloridovým iontem a rozpouštědlem (červené body). (c) Znárodnění plochy homotetrameru luciferázy NanoLuc a chloridového iontu v jejím středu (zelený bod). (d) Průřez znárodněním plochy homotetrameru, který ukazuje (zeleně) intramolekulární kavity uvnitř protomerů a (červeně) mezimolekulární kavity na povrchu jednotlivých protomerů.

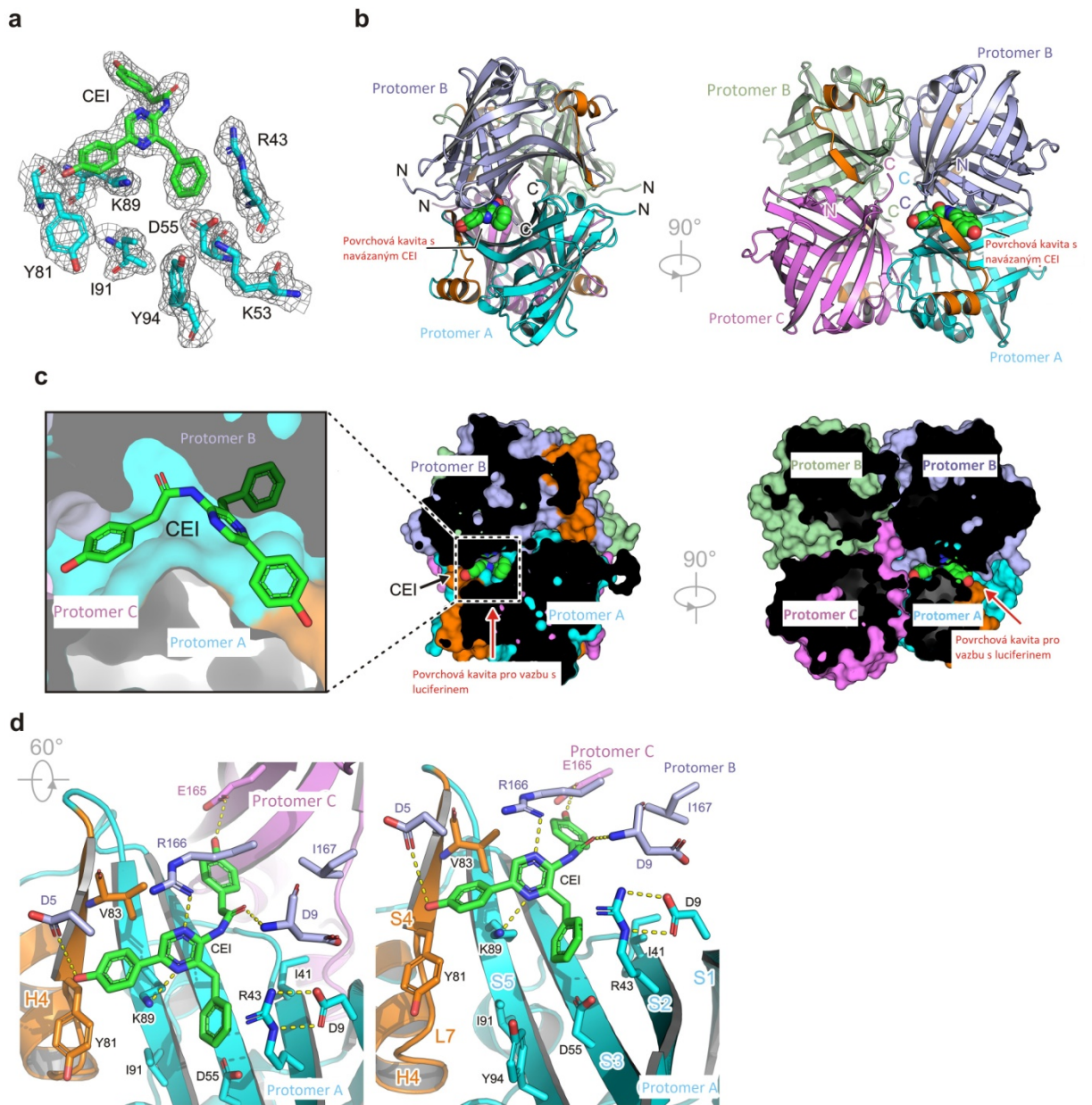
Samotná kavita je tvořena čtyřmi listy jednoho NanoLuc protomeru. Listy S3 a S4 představují dno, zatímco listy S1 a S5 plní funkci stěn tohoto luciferin-vazebného místa. Horní strana kavity je tvořena N-koncem druhého monomeru, hlavně aminokyselinami E4, V7, G8 a D9. Zadní strana kavity je pak dána C-konci obou NanoLuc molekul, které tvoří homodimer.

Luciferin FMA se do tohoto místa váže třemi substituenty. První z nich, 2-(furan-2-yl) díky hydrofobnímu charakteru reaguje s Y94 a též tvoří tzv. aromatickou stacking interakci s Y81. Tyto dvě skutečnosti způsobuje umístění interakce dvou tyrosinů v bezprostřední blízkosti. Tento substituent se také interaguje s kationtem v K89. Druhý substituent, 6-fenyl, má též nepolární charakter, díky němuž interaguje s D9, I41 a I167, a je umístěn uvnitř kavity. Poslední substituent, 8-benzyl, stejným typem interaguje s V7 druhého monomeru a V83 prvního monomeru.

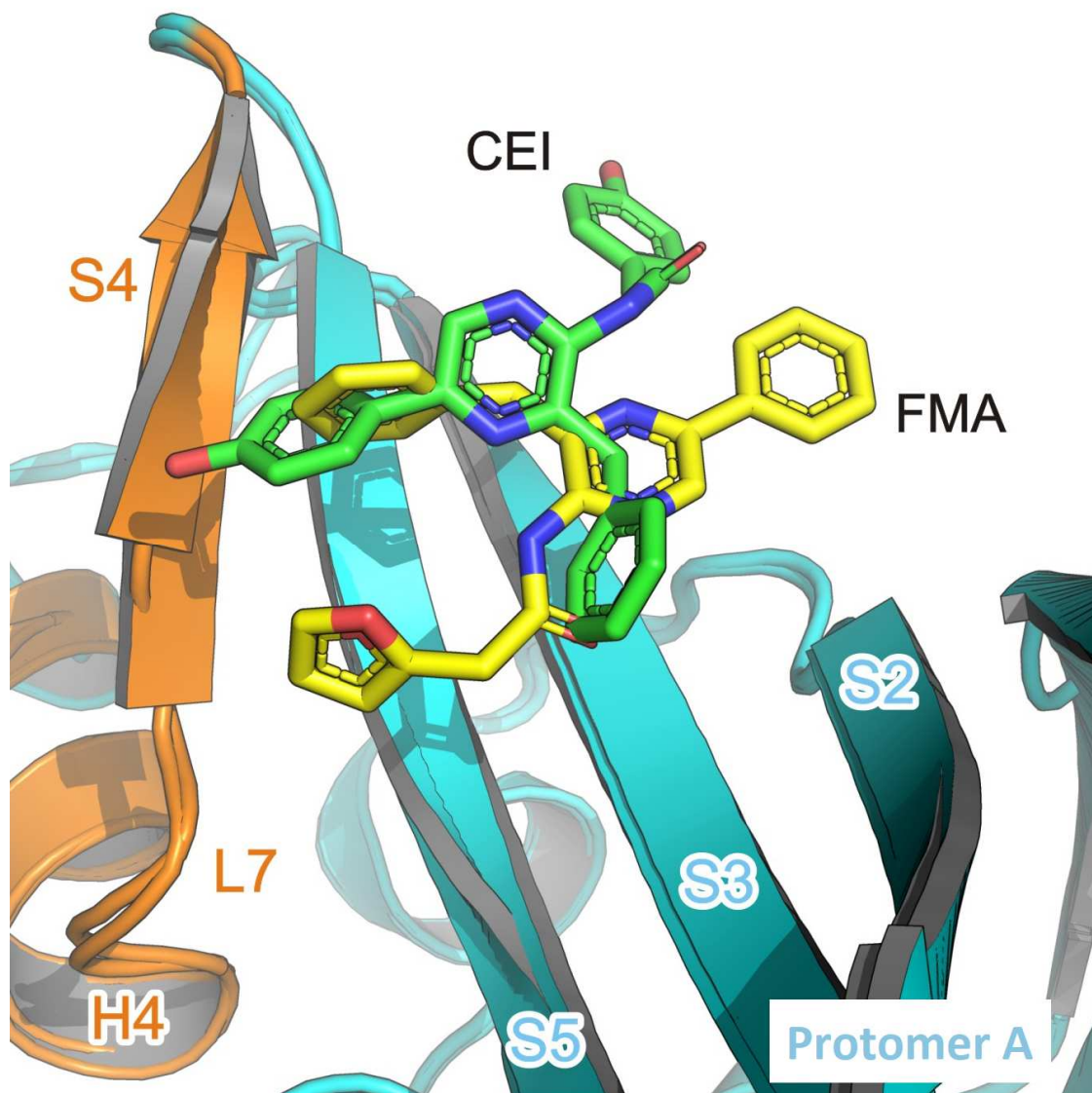


Obr. 6 Vazba luciferinu FMA v povrchové kavitě luciferázy NanoLuc. (a) Mapa 2Fo-Fc povrchové kavity s navázaným luciferinem FMA. (b) Grafické zobrazení navázání luciferinu FMA (žlutě) v povrchové kavitě tvořené asymetrickým dimerem (kde protomer A je znázorněn azurově a protomer B je znázorněn modře). (c) Přiblížený pohled na interakce mezi luciferinem FMA a postranních řetězců aminokyselin v aktivním místě. (d) Průřez zobrazením povrchu a přiblížení na aktivní povrchovou kavitě s navázaným luciferinem FMA.

V naší krystalografické analýze se nám též podařilo vyřešit strukturu NanoLuc enzymu s navázaným luciferinem CEI. Tento luciferin se váže též do stejné kavity, ovšem s tím rozdílem, že je oproti FMA otočený o cca 120°. Jeho první substituent, 2-(p-hydroxyfenyl), tvoří vodíkový můstek s E165 třetího monomeru. Zároveň karbonyl a dusíky v blízkosti tohoto substituentu tvoří vodíkový můstek s D9, K89 a R166. Druhý substituent, 2-(p-hydroxyfenyl), interaguje s Y81 a D5. Otázkou zůstává, proč se molekuly luciferinu vážou do tohoto povrchového místa a jakou funkci toto povrchové luciferin-vazebné místo sehrává v biologii tohoto enzymu.



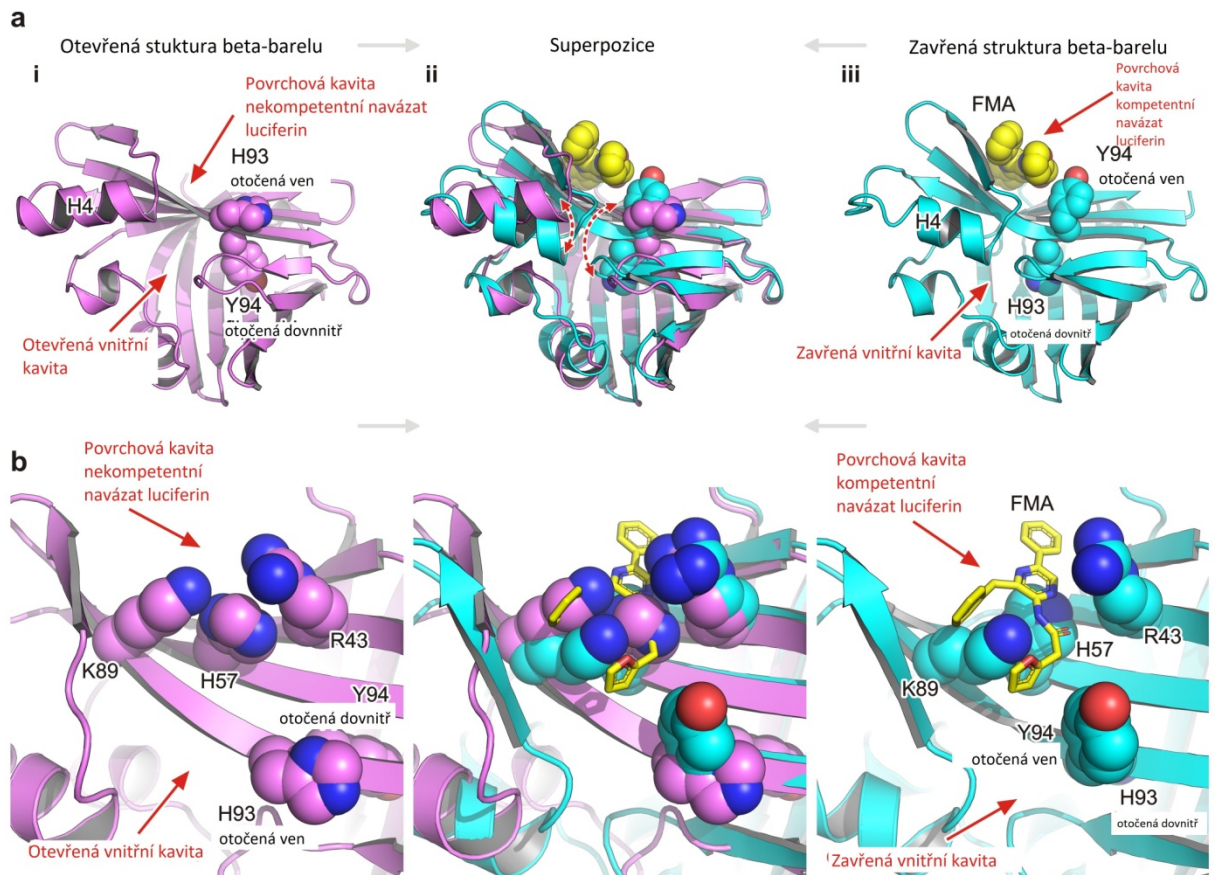
Obr. 7 Vazba luciferinu CEI v povrchové kavitě tvořené homotetrametrickou strukturou luciferázy NanoLuc. (a) Mapa 2Fo-Fc povrchové kavitě s navázaným luciferinem CEI. (b) Grafické zobrazení homotetrametrické struktury s povrchovou kavitou s navázaným luciferinem CEI z boku a zepředu. (c) Průřez znázorněním povrchu z boku a zepředu a přiblížení na povrchovou kavitou s navázaným luciferinem CEI (zeleně). (d) Grafické zobrazení interakce luciferinu CEI s postranními řetězci aminokyselin přítomných v povrchové kavitě.



Obr. 8 Superpozice vazby luciferinů FMA a CEI v povrchové kavitě vytvořené homotetramerní strukturou luciferázy NanoLuc. Luciferiny CEI a FMA a jsou vzájemně otočené o cca 120°.

Následně po krystalografické analýze proběhlo srovnání vyřešených struktur s navázaným luciferinem CEI nebo FMA a se strukturami bez navázaného luciferinu vyřešenými Dr. Tomabechi[6] a Dr. Inouye[7]. Toto srovnání ukázalo klíčové rozdíly mezi tzv. otevřenou a zavřenou strukturou β -soudku. Jedním z těchto rozdílů je otočení skládaného listu S5. To znamená, že v otevřené struktuře luciferázy NanoLuc bez navázaného luciferinu je postranní řetězec H93 na povrchu protomeru a postranní řetězec Y94 směřuje do vnitřku β -soudku, čímž jej činí objemnějším, zatímco zavřená struktura luciferázy s navázaným luciferinem v povrchové kapse směřuje postranní řetězec H93 do vnitřku β -soudku a postranní řetězec Y94 na povrch. Díky těmto konformačním změnám může probíhat tzv. homotropický negativní alosterický mechanismus, což znamená, že luciferin se může vázat buď na povrchové alosterické místo, popsané v předchozím textu, při zavřené konformaci, nebo přímo v katalytickém místě uvnitř β -soudku při otevřené konformaci, nikdy však nemohou být navázané dva zároveň v obou zmíněných místech. Přítomnost dvou různých struktur a

role aminokyseliny Y94 v jejich změně může být klíčovým objevem pro charakteristiku alosterické regulace luciferázy NanoLuc. Na to ukazuje i skutečnost, že při zavřené konformaci se dovnitř β -soudku mohou navázat dva chloridové ionty, čímž zabrání katalytické činnosti luciferázy.



Obr. 9 Zobrazení rozdílu mezi otevřenou a zavřenou strukturou β -soudku.(a)Grafické zobrazení struktury (i) otevřeného β -soudku a tedy přístupnou vnitřní kavitou a nepřístupnou povrchovou kavitou, (iii) zavřeného β -soudku s nepřístupnou vnitřní kavitou a přístupnou povrchovou kavitou s navázaným luciferinem FMA a (ii) jejich superpozice. (b) Přiblížený pohled na povrchovou kavitou při (i) otevřeném β -soudku, (iii) zavřeném β -soudku a (ii) jejich superpozice.

5.2 Mapování luciferin-vazebného povrchového místa

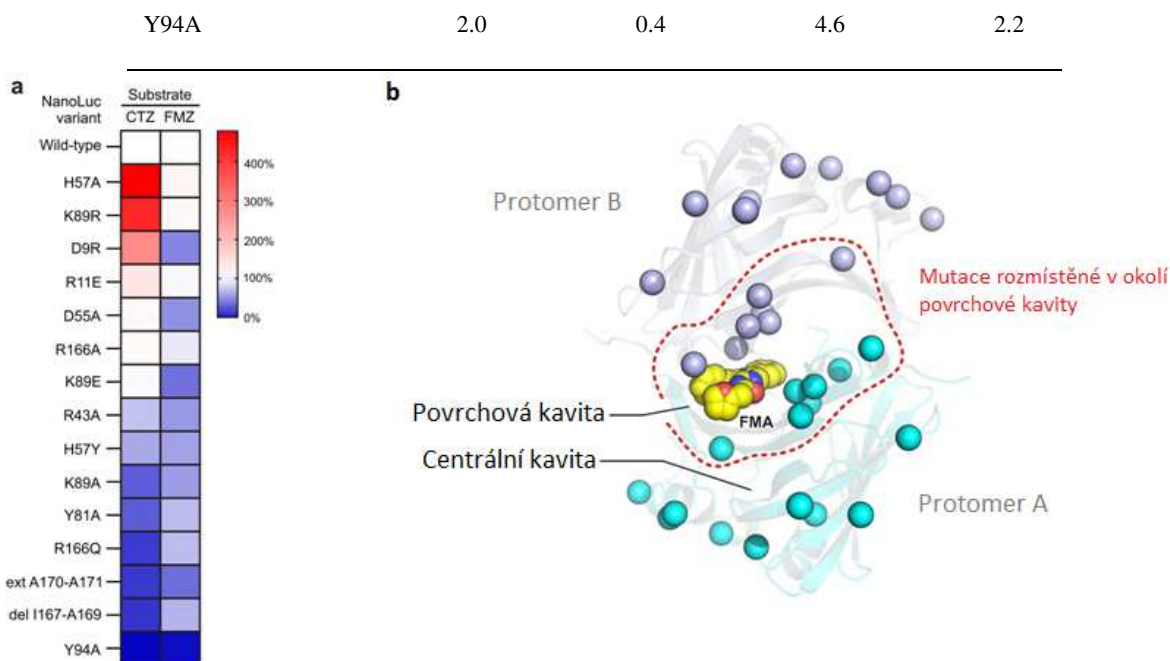
Ačkoliv má NanoLuc tolik potenciálních využití, má i některé nevýhody. Jednou z nich je samotný luciferin FMZ, který nejen že je výrazně dražší, ale je i cytotoxický jak pro *in vitro*, tak *in vivo* kultivované buňky[5], což může být překážkou pro širší využití této luciferázy.

Jedním z hlavních cílů mého projektu bylo zmapovat luciferin-vazebné místo pomocí cílené mutagenese, a zjistit tak jaké aminokyseliny jsou klíčové pro navázání luciferinu a charakterizovat jejich bioluminiscenční chování s FMZ a CTZ luciferiny. Zkoumané jednobodové substituce, ale též prodloužení C-konce o dva alaniny (NanoLuc ext A170-A171) či jeho zkrácení o tři aminokyseliny (NanoLuc del I167-A169), které jsme vytvořili, jsou vypsány v Tab. 1 a Obr. 9. Pomocí rekombinantní exprese a afinitní purifikace jsme

všechny vytvořené mutantní enzymy připravili v dostatečném množství a čistotě pro jejich biochemickou charakterizaci. Všechny varianty luciferázy byly purifikovány jako velmi solubilní proteiny. Co se týče luciferázové aktivity, tak všechny mutace v luciferin-vazebném místě vedly ke snížení aktivity s FMZ jako luciferinem. S CTZ byla ovšem situace jiná, zde některé mutace též vedly ke snížení aktivity, avšak některé mutace naopak luciferázovou aktivitu zvyšovaly. Největší relativní aktivitu s CTZ vykazovaly mutace D9R, H57A a K89R. Na základě tohoto zjištění byly tyto mutace postupně kombinatoricky spojeny do příslušných dvou- a tříbodových mutantů. Následně byla zkoumána jejich aktivita, kinetika, stabilita a struktura.

Tab. 6. Relativní luminiscenční aktivity variant NanoLuc luciferázy měřených s CTZ a FMZ luciferiny. Data uvádějí průměr relativních luciferázových aktivit (původní NanoLuc = 100 %), chyba měření je ošetřena hodnotami směrodatných odchylek. Měření proběhlo v triplicátu.

NanoLuc varianta	CTZ-luminiscence		FMZ-luminiscence	
	Relativní aktivita (%)	SD (%)	Relativní aktivita (%)	SD (%)
wild-type	100	27.6	100	2.9
D9R/K89R	1100.1	189.2	86.8	13.1
D9R/H57A/K89R	859.8	210.1	87.3	16.3
H57A/K89R	524.6	124.1	135.3	28.9
H57A	478.5	262.4	113.5	45.5
K89R	419.3	143.4	109.7	29.4
D9R/H57A	346.0	49.3	28.1	5.3
D9R	272.1	112.5	52.5	24.5
R11E	138.5	1.9	97.1	2.9
D55A	109.3	26.1	56.4	2.1
R166A	104.5	50.0	91.3	33.1
K89E	97.9	6.8	44.1	3.1
R43A	76.1	26.3	59.6	15.5
H57Y	65.9	13.3	63.5	7.1
K89A	36.3	13.8	61.2	5.0
Y81A	35.7	7.2	73.5	4.7
R166Q	22.9	9.6	73.5	0.1
del I167-A169	20.6	4.6	70.1	4.4
ext A170-A171	22.0	1.8	43.2	2.5



Obr. 10 (a) Teplotní mapa relativních aktivit jednotlivých luciferázových variant. (b) Grafické zobrazení 16 substitucí udělaných v inženýrství původní luciferázy NanoLuc v kontextu asymetrického dimeru. Červeně zvýrazněné jsou mutace, které jsou rozmístěné v okolí zkoumané povrchové kavity.

5.3 Kinetická analýza luciferázových variant

Ačkoliv jednobodové substituce v místě povrchového alosterického místa luciferázových variant měly na aktivitu enzymaticky katalyzované oxidace CTZ často negativní vliv, některé z nich, konkrétně substituce D9R, H57A a K89R, tuto aktivitu zvýšily, a to až 4,5-krát. Nově syntetizované luciferázové varianty s dvoubodovými či třibodovými substitucemi tuto aktivitu dokázaly zvýšit až 11-krát (Tab. 1).

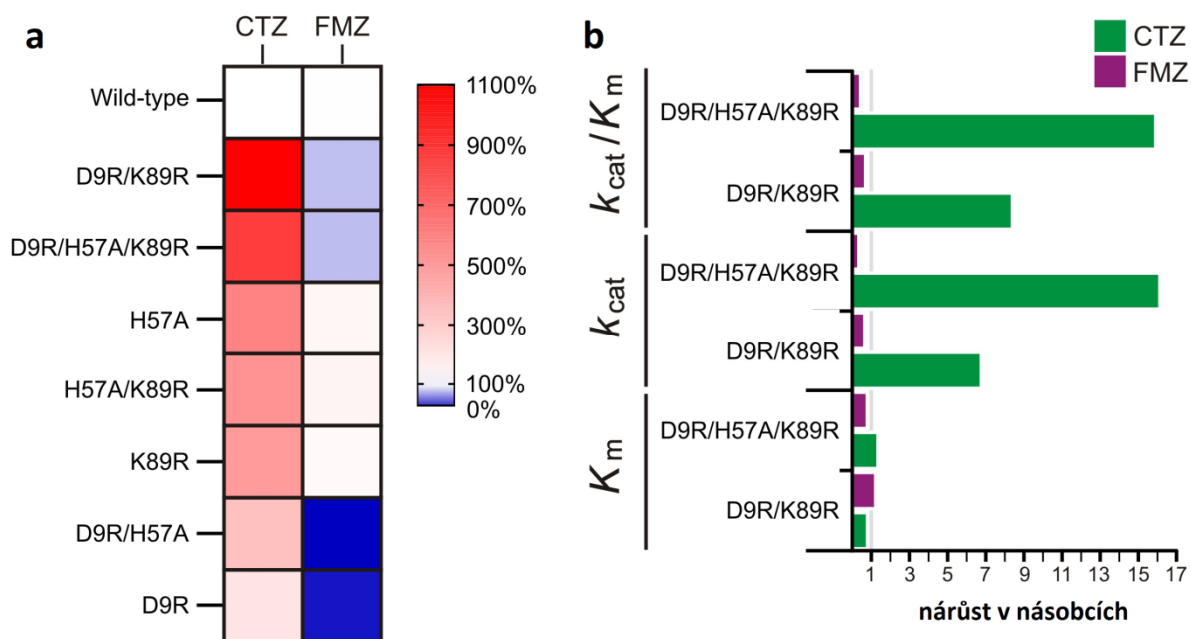
Zároveň byla těmto luciferázovým variantám pomocí metody nanoDSF změřena teplota tání (T_m), a tedy srovnána stabilita jednotlivých variant, což je klíčová vlastnost pro laboratorní využití. Zde lze pozorovat klesající trend závislosti stability na rostoucím množství substitucí. Rozdíl mezi původní luciferázou NanoLuc a NanoLuc D9R/K89R/H57A je až o 15°C. Nejmenší stabilitu vykazují enzymy s alespoň jednou mutací D9R. Naopak největší stabilitu vykazují luciferázy se substitucí H57A, což zajímavě doplňuje fakt, že tyto mutanti mají nejnižší aktivitu. Konkrétní hodnoty středních a finálních teplot tání jsou zapsány v tabulce 2.

Tab. 7 Teploty tání a teploty, při kterých je zagregován veškerý protein, klíčových variant NanoLuc luciferázy. Data uvádějí průměr jednotlivých naměřených teplot tání (T_m a T_{m1}). Měření proběhlo v triplikátu.

Varianta luciferázy	T_m (°C)	SD (T_m)	T_{m1} – agregován všechn protein (°C)	SD (T_{m1})
NanoLuc původní	59,0	0,2	63,5	0,1

D9R	49,9	0,2	53,7	0,0
H57A	58,0	0,2	62,8	0,0
K89R	56,7	0,2	61,6	0,0
D9R/K89R	45,8	0,2	50,9	0,0
H57A/K89R	52,2	0,1	56,6	0,0
D9R/H57A	48,6	0,5	53,9	0,1
D9R/H57A/K89R	44,0	0,1	49,0	0,0

Pro dvě luciferázové varianty s největší aktivitou bioluminiscence byly též změřeny kinetické konstanty a emisní spektra pro lepší porozumění důvodu vzrůstu jejich aktivity pouze s luciferinem CTZ. Tato měření ukázala, že dvoubodová substituce D9R/K89R zvyšuje katalytickou účinnost reakce s luciferinem CTZ (k_{cat}/K_m) cca 10-krát, a tříbodová substituce D9R/K89R/H57A katalytickou účinnost zvyšuje dokonce cca 15,9-krát. Důvod této změny je rychlostní konstanta reakce k_{cat} , která se u luciferázy s mutacemi D9R/K89R/H57A, později pojmenované jako NanoLuc^{CTZ}, zvýšila cca 16,1-krát, zatímco konstanta popisující vazbu mezi enzymem a luciferinem (K_m) a konstanta popisující rozpad komplexu enzym-produkt (K_p) byly téměř stejné jako konstanty původní luciferázy. Zároveň katalytická účinnost luciferázy NanoLuc^{CTZ} s luciferinem CTZ ($k_{\text{cat}}/K_m = 70 \pm 7 \text{ s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$) je podobná katalytické účinnosti původní luciferázy NanoLuc s luciferinem FMZ ($k_{\text{cat}}/K_m = 64 \pm 2 \text{ s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$). Hodnoty katalytických účinností jednotlivých luciferázových variant s luciferinem FMZ byly cca 2-krát nižší než u původní luciferázy NanoLuc.

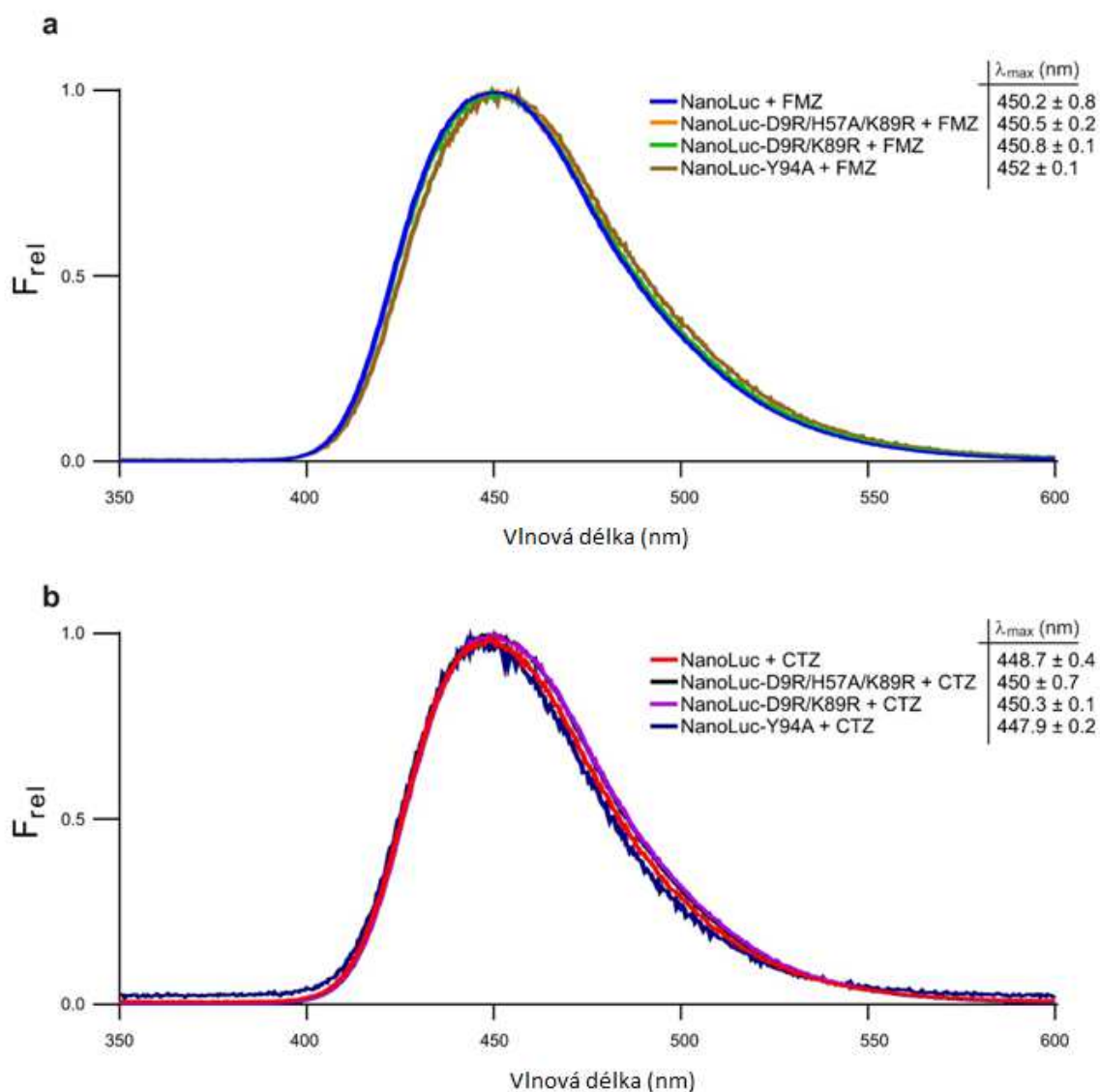


Obr. 11 (a) Teplotní mapa relativních luminescenčních aktivit klíčových variant luciferázy NanoLuc. (b) Graf relativních hodnot katalytické účinnosti reakce (k_{cat}/K_m), rychlostní konstanty reakce (k_{cat}) a Michaelisovy konstanty (K_m) pro varianty D9R/K89R a D9R/K89R/H57A luciferázy NanoLuc.

Tab. 8 Kinetické parametry – Michaelisova konstanta, popisující vazbu mezi enzymem a substrátem (K_m), rychlostní konstanta reakce (k_{cat}), konstanta, popisující rozpad komplexu enzym-substrát (K_p) a katalytická účinnost reakce (k_{cat}/K_m) – klíčových variant luciferázy NanoLuc.

Varianta enzymu	$K_m / \mu\text{M}$	k_{cat} / s^{-1}	$K_p / \mu\text{M}$	$k_{cat}/K_m / \text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$
CTZ-luminiscence				
NanoLuc	0.57 ± 0.02	2.48 ± 0.05	0.256 ± 0.005	4.4 ± 0.2
NanoLuc-Y94A	3.74 ± 0.09	0.225 ± 0.004	0.79 ± 0.04	0.060 ± 0.001
NanoLuc-D9R/K89R	0.46 ± 0.01	16.8 ± 0.6	0.163 ± 0.006	37 ± 1
NanoLuc-D9R/H57A/K89R	0.77 ± 0.07	40 ± 4	0.23 ± 0.02	70 ± 7
FMZ-luminiscence				
NanoLuc	0.123 ± 0.004	7.88 ± 0.03	0.56 ± 0.01	64 ± 2
NanoLuc-Y94A	1.29 ± 0.02	0.519 ± 0.007	0.85 ± 0.02	0.402 ± 0.006
NanoLuc-D9R/K89R	0.157 ± 0.009	5.2 ± 0.1	0.39 ± 0.03	33 ± 2
NanoLuc-D9R/H57A/K89R	0.098 ± 0.005	2.74 ± 0.03	0.34 ± 0.02	28 ± 1

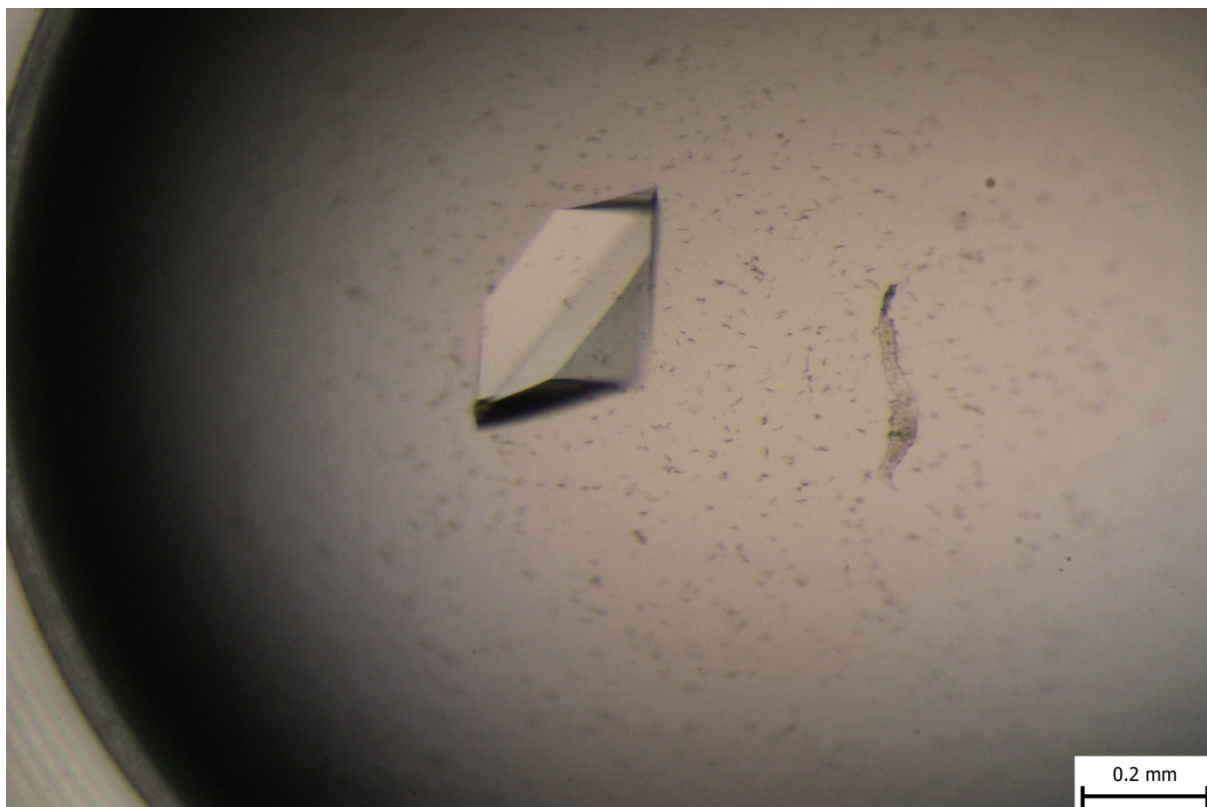
Emisní spektrum luciferázy NanoLuc^{CTZ} bylo při reakci s luciferinem CTZ posunuto o ~2 nm směrem k červené barvě, zatímco při reakci s luciferinem FMZ zůstalo nezměněné.



Obr. 12 Emisní spektrum a emisní maxima reakce klíčových variant luciferázy NanoLuc s luciferinem (a) FMZ a (b) CTZ. Hodnoty emisních maxim jsou průměrem tří nezávislých měření. Chyba je ošetřena směrodatnou odchylkou (SD).

5.4 Krystalografická analýza luciferinu v katalytickém místě

Pro lepší porozumění katalýzy luciferázy NanoLuc^{CTZ} byla provedena krystalografická analýza jejího komplexu s luciferinem CTZ a jeho neoxidovatelnou formou azaCTZ[28] (Obr. 1). Ačkoliv kokrystalizace komplexu s luciferinem CTZ nebyla úspěšná, podařilo se nám vytvořit kvalitní krystaly s příhodnými difrakčními vlastnostmi pro komplex s analogem CTZ, azaCTZ.



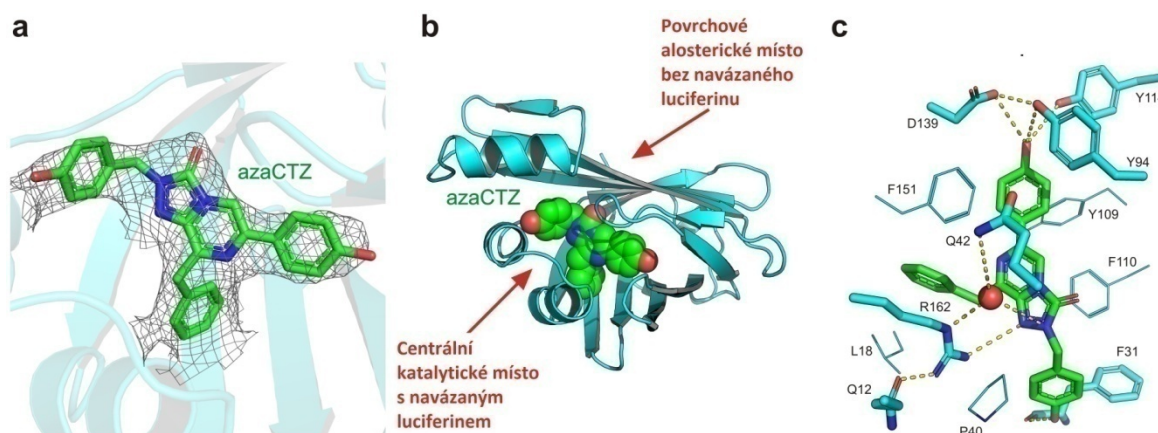
Obr. 13 Krystal komplexu luciferázy NanoLuc^{CTZ} a neoxidovatelné formy luciferinu azakoelesterazin.

Mapy elektronových hustot vypočtené na základě dat, získaných rentgenovou krystalografií daných komplexů, ukázaly luciferázu ve své otevřené formě s luciferinem navázaným uvnitř β -soudku luciferázy.

Jádro azaCTZ tvořené triazolopyrazinem je umístěno uvnitř β -soudku, a obklopené je nejčastěji hydrofobními a aromatickými postranními řetězci sousedních aminokyselin. Dusík N1 tohoto jádra azaCTZ se nachází velmi blízko postranního řetězce aminokyseliny R162, která by z tohoto důvodu mohla mít důležitou roli v protonaci vzniklého aniontu CEI N1⁻. Zároveň R162 je situován v blízkosti postranního řetězce aminokyseliny Q12, kde je též situována molekula vody, nacházející se nad triazolopyrazinovým jádrem azaCTZ. Tato molekula vody by mohla nahrazovat molekulu kyslíku O₂, která oxiduje luciferin CTZ na jeho uhlíku C2, což by znamenalo, že aminokyselina R162 má klíčové funkce jak v prostorové koordinaci molekul luciferinu a kyslíku O₂, aby vzájemně interagovaly, tak i v protonaci produktu CEI, zabezpečující vyšší intenzitu luminiscence. Zároveň není v okolí jádra přítomna žádná skupina, jež by zprostředkovala deprotonaci luciferinu CTZ na dusíku N7, popřípadě jeho tautomeru O10H. Tuto skupinu též nemají luciferázy typu *Renilla*[28].

Podobnost s ostatními strukturně nepříbuznými luciferázami vykazuje luciferáza NanoLuc i v podpoře tvorby fenolátového aniontu emitujícího modré světlo a ve vyladění nábojů v CEI, a to konkrétně pomocí vodíkového můstku mezi postranními řetězci aminokyselin D139, Y114 a Y94 s hydroxylovou funkční skupinou substituentu R² 6-(*para*-hydroxyfenyl) luciferinu, který je ukotven uvnitř β -soudku. Zbylé substituenty, R¹ 6-(*para*-hydroxyfenyl)

a R³ 8-benzyl, jsou v kontaktu převážně s hydrofobními a aromatickým skupinami uvnitř barelu. Výjimkou je vodíkový můstek mezi hydroxylovou skupinou substituentu R¹ 6-(*para*-hydroxyfenyl) a karbonylu na hlavním řetězci aminokyseliny F31.

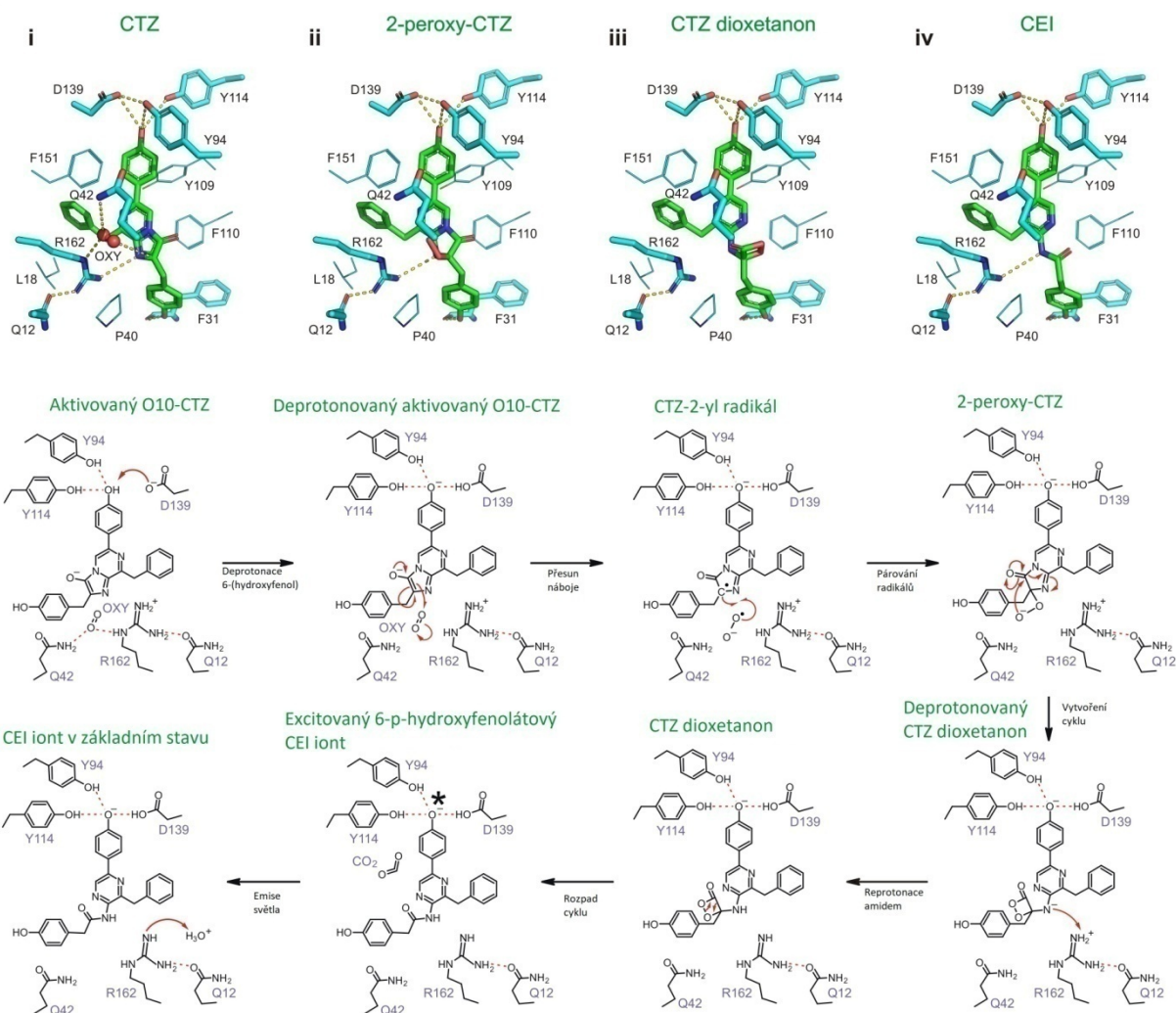


Obr. 14 Vazba azaCTZ v katalytickém místě luciferázy NanoLuc. (a) 2Fo-Fc mapa katalytického místa luciferázy NanoLuc^{CTZ} s navázaným analogem luciferinu azaCTZ. (b) Grafické znázornění vazby analogu luciferinu azaCTZ v centrálním katalytickém místě za otevřeného stavu β -soudku. (c) Přibližné znázornění jednotlivých interakcí analogu luciferinu azaCTZ s postranními řetězci aminokyselin přítomných v centrální kavitě luciferázy NanoLuc^{CTZ} a s molekulou vody (červený bod).

5.5 Návrh katalytického mechanismu luciferázy NanoLuc

Výše uvedená krystalografická analýza, která ukazuje analog luciferinu azaCTZ navázaný v katalyticky příhodném místě luciferázy NanoLuc^{CTZ}, nám umožnila návrh katalytického mechanismu oxidace luciferinu CTZ luciferázami typu NanoLuc. Znalost této struktury nám umožnila vytvořit model vazebných režimů nativního luciferinu CTZ, dvou reakčních meziproductů 2-peroxy-CTZ a dioxethan-CTZ a produktu CEI. Začátkem mechanismu je vstup luciferinu CTZ do β -soudku luciferázy. Imidazopyrazinonové jádro luciferinu CTZ je deprotonováno již ve vodném prostředí, neboť jeho pK_a má hodnotu podobnou fyziologickému pH[28]. Po navázání luciferinu do katalytického místa, aspartát v pozici 139 deprotonuje funkční hydroxylovou skupinu substituentu R² 6-(*para*-hydroxyfenyl) luciferinu CTZ za vzniku dianionového O10-CTZ. Tato deprotonace ovlivňuje emisní maximum emitovaného světla. Zároveň po navázání luciferinu CTZ vzniká ternární komplex enzym-kofaktor-substrát, kde postranní řetězec aminokyseliny R162 pomáhá umístit molekulu kyslíku O₂, tak aby mohla reagovat s uhlíkem C2 dianionového CTZ. Náš návrh mechanismu je analogický k reakci luciferázy RLuc, kde k počáteční interakci dochází prostřednictvím přesunu náboje, přičemž vznikají radikálové meziproducty. Párováním těchto radikálů vzniká aniont 2-peroxy-CTZ. Ten poté vytvoří cyklus pomocí nukleofilní adičně-eliminací reakce. Tímto krokem vzniká nestabilní dioxethanonová struktura s deprotonovanou amidovou skupinou, která má vysokou energetickou bilanci. Po vytvoření tohoto CTZ-dioxethanonu aminokyselina R162 protonuje danou amidovou skupinu pro zajištění vyšší intenzity luminiscence. Následně se nestabilní dioxethanonový cyklus rozpadá za uvolnění energie, jež excituje uhlík C2 CEI. Ten energii uvolní, když se vrací do základního stavu v podobě fotonu, a tedy emituje světlo. Aminokyselina R162 je následně reprotonována z molekuly vody.

Součástí návrhu je také teorie, že konformační přechod mezi otevřenou a zavřenou strukturou luciferázy může napomáhat vyvázání CEI a regeneraci luciferázy pro další katalytický cyklus. Návrh mechanismu je graficky znázorněn v obrázku 13.



Obr. 15 Návrh mechanismu katalýzy luciferázy NanoLuc^{CTZ}. (a) Přiblížený pohled na interakce v aktivním místě s modely klíčových molekul pravděpodobného mechanismu - (i) CTZ, (ii) 2-peroxy-CTZ, (iii) CTZ-dioxethanonu a (iv) CEI. Postranní řetězce jednotlivých aminokyselin přítomných v aktivním místě jsou znázorněny zeleně, oxidující molekula kyslíku O₂ červeným bodem a vodíkové můstky čárkovanou přímkou. (b) Schéma návrhu mechanismu oxidace CTZ katalyzovaného luciferázami typu NanoLuc. CTZ vstupuje do aktivního katalytického místa (již v deprotonované formě, díky jeho pK_a blízkí se hodnotě fyziologického pH[28]) a jeho funkční skupina OH C6-(p-hydroxyfenyl) substituentu tvoří vodíkový můstek s tyrosiny Y94 a Y114. Zároveň je deprotonována aspartátem D139 za vzniku dianiontu O10-CTZ. V Michaelisově komplexu enzym-substrát-kofaktor postranní řetězec aminokyseliny R162 umístí molekulu kyslíku O₂ tak, aby mohla být atakována uhlíkem C2 O10-CTZ. Tento krok by mohl být uskutečněn pomocí přenosu náboje. Následně dojde ke spárování radikálů za vzniku 2-peroxy-CTZ. Ten následně vytvoří cyklus za vzniku CTZ-dioxethanonu pomocí nukleofilního adičně-eliminacího mechanismu. Následně je zatím deprotonovaný CTZ-dioxethanon protonován aminokyselinou R162. Po protonaci dochází k rozpadu dioxethanového cyklu za vzniku excitovaného produktu CEI. Ten se navrácí do základního stavu vyzářením fotonu, zatímco aminokyselina R162 se reprotonuje z přítomné molekuly vody.

6. DISKUZE

Ačkoliv má vysoce výkonná a elegantní luciferáza NanoLuc v biotechnologiích široký výběr využití[4], molekulární podstata, na které stojí její katalýza, zůstává záhadou [3, 6, 7, 29]. Důvodem proto je nedostatek informací o katalyticky účinném komplexu luciferáza-luciferin. Proto jsme se pokusili tyto informace doplnit krystalografickou analýzou. Díky strukturní podobnosti luciferázy NanoLuc s proteiny vázajícími vyšší mastné kyseliny (anglicky fatty acids binding proteins, zkráceně FABPs)[6] se předpokládalo, že se luciferin bude vázat do centrální kavity[3, 6, 7], kam se v případě FABPs typicky váží vyšší mastné kyseliny[30, 31, 32]. Navzdory tomuto očekávání se ale luciferin často váže do kavity, nacházející se na povrchu luciferázy NanoLuc.

Důležitou otázkou je tedy funkce povrchové kavity, do které se luciferin váže. Krystalografickou analýzou komplexu azaCTZ a luciferázy NanoLuc^{CTZ} v této práci je potvrzeno, že katalytické místo pro luciferin koelenterazin se nachází uvnitř β -soudku. Tak tomu ovšem může být, pouze pokud se luciferáza nachází v tzv. otevřené konformaci, která se vyznačuje tyrosinem 94 mířícím do vnitř β -soudku. Změna mezi touto a tzv. zavřenou konformací, kde Y94 míří na povrch luciferázy, by mohla hrát důležitou roli ve vázání a vyvazování luciferinu, což odpovídá chování skupiny nespécifikované lipidy přenášejících proteinů (anglicky non-specified lipid transfer proteins, zkráceně nsLTP)[33, 34]. Tato skupina je luciferáze NanoLuc podobná nejen v přítomnosti centrální hydrofobní kavity pro navázání lipidu, ale i přítomností povrchové kavity[33]. Proteiny nsLTP využívají různé konformační změny pro efektivní navázání a vyvázání lipidu do centrální kavity[33, 34]. Podobný mechanismus by tedy mohl probíhat i v komplexu luciferázy NanoLuc a luciferinu. V takovém případě by se jednalo o tzv. homotropní alosterickou inhibici, kde by navázání luciferinu do povrchové kavity aktivně bránilo navázání další molekule luciferinu do katalytického místa.

Ačkoliv je luciferáza NanoLuc monomerní enzym[3, 29], většina jejích krystalických analýz ji ukazuje jako těsný homotetramer, složený ze čtyř stejných protomerů v uzavřené konformaci, jež umožňuje navázání luciferinu do povrchové kavity. Tato povrchová kavita mezi homodimery tvořícími homotetramer luciferázy má vlastnosti tzv. molekulového lepidla (anglicky molecular glue, zkráceně MG)[35, 36]. Tento jev se vyznačuje zvýšením původně zanedbatelné vzájemné afinity dvou proteinů, pomocí ligandu[35], v našem případě samotného luciferinu. Strukturní analýza zároveň ukázala místa určená pro navázání chloridových iontů jak na povrchu luciferázy, tak uvnitř β -soudku, což může poukazovat na vliv koncentrace chloridových iontů na konformaci luciferázy a tedy její aktivitu, který potvrzují studie Tausifa Altamasch[37]. Podle této teorie by se v momentě, kdy kreveta vyplivne sekret do vody okolo sebe, aby zastrašila predátora, snížila koncentrace iontů Cl⁻ a proteinový a katalyticky inaktivní homotetramer, využitý krevetou pro ušetření místa při skladování enzymu, by se rozpadl na jednotlivé monomerní a katalyticky aktivní luciferázy. Ty změní svojí konformaci ze zavřeného β -soudku na otevřený, což vede k převázání luciferinu z povrchové kavity do katalytického místa. Tento mechanismus by

se dal využít jako indikátor koncentrace iontů NaCl, čehož by se dalo využít v potravinářství, průmyslu, ale i v medicíně při vyšetření funkce ledvin.

Abychom vyloučili, že vazba luciferinu do povrchového alosterického místa je pouze experimentální artefakt, vzniknuvší během krystalizačních pokusů, byla provedena komplexní mutageneze této povrchové kavity. Tyto experimenty prokázaly komunikační cestu mezi alosterickým a katalytickým místem, kdy komplexní mutageneze alosterického místa dokázala až 11-krát zvýšit aktivitu enzymu. Zajímavé je také to, že varianty, které jsme dělali my, jsou od předchozích mutací firmy Promega naprosto odlišné, a přesto navrací vysokou aktivitu s luciferinem koelenterazinem. Naproti tomu profesor Inouye aktivitu s luciferinem CTZ navrací pomocí reverzních mutací aminokyselin, zmíněných v článku Hall et al.[7].

Struktura komplexu luciferázy NanoLuc^{CTZ} s navázaným luciferinovým analogem azaCTZ pomohla odhalit vlastnosti katalytického místa, což umožnilo navrhnout mechanismus bioluminiscenční reakce. Ten odhaluje podobnost s nedávno objeveným mechanismem luciferázy RLuc[28], kde je modrá barva luminiscence zajištěna fenolátovým aniontem [28, 38, 39, 40, 41], získaným pomocí deprotonace aspartátovým residuem [28]. Stejně tak je tomu u luciferázy NanoLuc, kde aspartát D139 s podporou tyrosinů 94 a 114 pomáhá vyladit elektronový stav produktu, což vede pravděpodobně k vytvoření fenolátového aniontu, který emituje modré světlo. Tato podobnost tedy ukazuje, že aspartátem zprostředkovaná deprotonace je typická pro mořské bioluminiscenční organismy používající luciferin CTZ[28].

Další otázkou je, proč, pokud luciferáza NanoLuc takto efektivně funguje i samostatně s luciferinem CTZ, se v krevetě nachází kromě katalyticky aktivní části luciferázy OLuc-19 i zbylá část OLuc-35. Jedná se o velký proteinový komplex. Jak je zmíněno v teoretickém úvodu, podjednotka OLuc-35 je podobná iLBP, které, jak říká jejich název, na sebe vážou nepolární sloučeniny. Tuto charakteristiku splňuje i substrát CTZ, což by mohlo naznačovat, že tato jednotka zajišťuje správný přechod luciferinu v mořské vodě z povrchové kavity do katalytického místa a zabraňuje zbytečnému unikání koelenterazinu do okolí.

7. ZÁVĚR

Hlavním nedostatkem pro odhalení mechanismu katalýzy luciferázy NanoLuc byla neznalost či omezené informace o její struktuře v komplexu s jednotlivými luciferiny a rozdíly mezi luciferiny FMZ a CTZ v jejich vazbě na enzym. V této práci jsme krystalografickou analýzou zjistili, že oba luciferiny se dokážou vázat do kavity, umístěné na povrchu jednotlivých protomerů v tetramerním uspořádání enzymu. Vzhledem k tomu, že se očekávala přítomnost luciferinu v centrální kavitě, tvořené β -soudkem, byla povrchová kavita zkoumána vytvořením luciferázových variant. Měření aktivity a kinetických konstant těchto variant ukázalo, kromě očekávaného snížení i prudký nárůst v případě bioluminiscenční oxidace CTZ. Z toho důvodu byla provedena krystalografická analýza struktury nejzářivější varianty, tzv. NanoLuc^{CTZ}. Ta odhalila, že katalytické místo luciferázy se nachází skutečně v centrální kavitě tvořené β -soudkem a umožnila tak navrhnout katalytický mechanismus luciferázy NanoLuc^{CTZ} a návrh homotropní alosterické inhibice, spočívající v konformační změně luciferázy.

Naše strukturní analýzy též poskytly pohled na to, jak mořské luciferázy zajišťují produkci fenolátového aniontu luciferinu CTZ, který je emituje modré světlo. Ve struktuře luciferázy NanoLuc^{CTZ} s navázaným luciferinovým analogem azaCTZ jsem ukázala, že aspartát 139 společně s tyrosiny 94 a 114 fixují molekulu luciferinu v katalytickém místě, a pravděpodobně zajišťují deprotonaci terminální hydroxylové skupiny luciferinu. Naše výzkumná skupina nedávno ukázala, že podobné interakce jsou též i u strukturně nepodobné mořské luciferázy z *Renilla reniformis*. Tato pozorování dokládají konvergentní evoluci mořských luciferáz. Zajímavé bude v budoucnu sledovat, zda podobné principy jsou uplatňovány i jinými mořskými luciferázami, jako např. luciferáza z *Gaussia princeps*.

Díky těmto zjištěním se mi podařilo zkonstruovat nové varianty NanoLuc luciferázy, které vykazují výrazně lepší katalýzu a produkci světla s původním nativním luciferinem CTZ, aniž by se ovšem dramaticky snížila jejich katalýza se syntetickým luciferinem FMZ. V rámci práce se mi tak podařilo zjistit principy, jak lze přeprogramovat substrátovou specificitu NanoLuc luciferázy. Tyto výsledky mají velký dopad pro využívání této luciferázy, neboť mnou vytvořené NanoLuc varianty jsou velmi efektivní s přirozeným luciferinem CTZ. Odpadá tedy nutnost kupovat extrémně drahý syntetický luciferin FMZ, který kromě jiného je též málo rozpustný a vykazuje cytotoxické efekty.

Výsledky mé práce jsou součástí vědecké publikace: „**Illuminating the mechanism and allosteric behavior of NanoLuc luciferase**“, která byla uveřejněna jako preprint na BiorXiv (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.12.05.519101v1>) a nyní je v recenzním řízení v časopise Nature Communications.

8. BIBLIOGRAFIE

- [1] SYED, Aisha J. Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond. *Chemical Society Reviews* [online]. 2021, **9**. Dostupné z: doi:10.1039/d0cs01492c
- [2] SHIMOMURA, Osamu, Takashi MASUGI, Frank H. JOHNSON a Yata HANEDA. Properties and reaction mechanism of the bioluminescence system of the deep-sea shrimp *Oplophorus graciliorostris*. *Biochemistry* [online]. 1978, **17**(6), 994–998. ISSN 0006-2960, 1520-4995. Dostupné z: doi:10.1021/bi00599a008
- [3] HALL, Mary P., James UNCH, Brock F. BINKOWSKI, Michael P. VALLEY, Braeden L. BUTLER, Monika G. WOOD, Paul OTTO, Kristopher ZIMMERMAN, Gediminas VIDUGIRIS, Thomas MACHLEIDT, Matthew B. ROBERS, Hélène A. BENINK, Christopher T. EGGERS, Michael R. SLATER, Poncho L. MEISENHEIMER, Dieter H. KLAUBERT, Frank FAN, Lance P. ENCELL a Keith V. WOOD. Engineered Luciferase Reporter from a Deep Sea Shrimp Utilizing a Novel Imidazopyrazinone Substrate. *ACS Chemical Biology* [online]. 2012, **7**(11), 1848–1857. ISSN 1554-8929, 1554-8937. Dostupné z: doi:10.1021/cb3002478
- [4] ENGLAND, Christopher G., Emily B. EHLERDING a Weibo CAI. NanoLuc: A Small Luciferase Is Brightening Up the Field of Bioluminescence. *Bioconjugate Chemistry* [online]. 2016, **27**(5), 1175–1187. ISSN 1043-1802, 1520-4812. Dostupné z: doi:10.1021/acs.bioconjchem.6b00112
- [5] SHIPUNOVA, V. O., O. N. SHILOVA, E. I. SHRAMOVA, S. M. DEYEV a G. M. PROSHKINA. A Highly Specific Substrate for NanoLUC Luciferase Furimazine Is Toxic in vitro and in vivo. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* [online]. 2018, **44**(2), 225–228. ISSN 1068-1620, 1608-330X. Dostupné z: doi:10.1134/S1068162018020085
- [6] TOMABECHI, Yuri, Takamitsu HOSOYA, Haruhiko EHARA, Shun-ichi SEKINE, Mikako SHIROUZU a Satoshi INOUYE. Crystal structure of nanoKAZ: The mutated 19 kDa component of *Oplophorus* luciferase catalyzing the bioluminescent reaction with coelenterazine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2016, **470**(1), 88–93. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2015.12.123
- [7] INOUYE, Satoshi, Jun-ichi SATO, Yuiko SAHARA-MIURA, Yuri TOMABECHI, Yuto SUMIDA, Shun-ichi SEKINE, Mikako SHIROUZU a Takamitsu HOSOYA. Reverse mutants of the catalytic 19 kDa mutant protein (nanoKAZ/nanoLuc) from *Oplophorus* luciferase with coelenterazine as preferred substrate. *PLOS ONE* [online]. 2022, **17**(9), e0272992. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0272992
- [8] RODA, Aldo. A History of Bioluminescence and Chemiluminescence from Ancient Times to the Present. In: *Chemiluminescence and Bioluminescence: Past, Present and Future*. 1. vydání. Londýn: Royal Society of Chemistry, 2012. ISBN 978-1-84755-812-1.
- [9] VAN WYHE, John. Voyages of the adventure and Beagle. *The complete work of Charles Darwin online* [online]. 2002. Dostupné z: <http://darwin-online.org.uk/content/frameset?viewtype=text&itemID=F10.2&pageseq=757>

- [10] FRAGA, Hugo. Firefly luminescence: A historical perspective and recent developments. *Photochemical & Photobiological Sciences* [online]. 2008, 7(2). Dostupné z: doi:10.1039/b719181b
- [11] MCELROY, William D. The Mechanism of Bioluminescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1944, 30(12). Dostupné z: doi:10.1073/pnas.30.12.377
- [12] BUSH, Stephanie L. Behaving in the Dark: Locomotor, Chromatic, Postural, and Bioluminescent Behaviors of the Deep-Sea Squid *Octopoteuthis deletron* Young 1972. *Biol Bull.* [online]. 2009, 7–22. Dostupné z: doi:10.1086/BBLv216n1p7
- [13] HOGUE, Charles L. *Latin american insect and entomology*. První. Los Angeles: The Regents of The University of California, 1993. ISBN 978-0-520-07849-9.
- [14] CZYZ, Agata, Borys WRÓBEL a Grzegorz WĘGRZYN. *Vibrio harveyi* bioluminescence plays a role in stimulation of DNA repair. *Microbiology* [online]. 2000, 146(2), 283–288. ISSN 1350-0872, 1465-2080. Dostupné z: doi:10.1099/00221287-146-2-283
- [15] *Bioluminescence.pdf* [online]. [vid. 2023-01-10]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/1431/podzim2006/Bi9902/um/Bioluminescence.pdf>
- [16] OKADA, Konisuke. Firefly bioluminescence III. Conversion of the oxyluciferin to luciferin in firefly. *Tetrahedron Letters* [online]. 1974, (32), 2771–2774. Dostupné z: doi:10.1016/s0040-4039(01)91738-1
- [17] *52314725.pdf* [online]. [vid. 2023-01-10]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/1431/podzim2014/C7955/52314725/>
- [18] HIRANO, Takashi. The Reaction Mechanism of Calcium-Activated Photoprotein Bioluminescence. *Current Pharmaceutical Biotechnology* [online]. 2012, 13(14), 2551–2561. ISSN 13892010. Dostupné z: doi:10.2174/138920101314151120122527
- [19] KREMERS, Gert-Jan, Sarah G. GILBERT, Paula J. CRANFILL, Michael W. DAVIDSON a David W. PISTON. Fluorescent proteins at a glance. *Journal of Cell Science* [online]. 2011, 124(2), 157–160. ISSN 1477-9137, 0021-9533. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.072744
- [20] LOENING, Andreas Markus, Timothy David FENN a Sanjiv Sam GAMBHIR. Crystal Structures of the Luciferase and Green Fluorescent Protein from *Renilla reniformis*. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2007, 374(4), 1017–1028. ISSN 00222836. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmb.2007.09.078
- [21] SHIMOMURA, Osamu. *Bioluminescence: chemical principles and methods*. B.m.: World Scientific, 2012.
- [22] HORI, Kazuo, Harry CHARBONNEAU, Russell C. HART a Milton J. CORMIER. Structure of native *Renilla reinformis* luciferin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1977, 74(10), 4285–4287. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.74.10.4285

- [23] SHIMOMURA, O. a P. R. FLOOD. Luciferase of the Scyphozoan Medusa *Periphylla periphylla*. *The Biological Bulletin* [online]. 1998, **194**(3), 244–252. ISSN 0006-3185, 1939-8697. Dostupné z: doi:10.2307/1543094
- [24] OBA, Yuichi, Hiroshi TSUDUKI, Shin-ichi KATO, Makoto OJIKI a Satoshi INOUE. Identification of the Luciferin–Luciferase System and Quantification of Coelenterazine by Mass Spectrometry in the Deep-Sea Luminous Ostracod *Conchoecia pseudodiscophora*. *ChemBioChem* [online]. 2004, **5**(11), 1495–1499. ISSN 1439-4227, 1439-7633. Dostupné z: doi:10.1002/cbic.200400102
- [25] ROBISON, Bruce H., Kim R. REISENBICHLER, James C. HUNT a Steven H. D. HADDOCK. Light Production by the Arm Tips of the Deep-Sea Cephalopod *Vampyroteuthis infernalis*. *The Biological Bulletin* [online]. 2003, **205**(2), 102–109. ISSN 0006-3185, 1939-8697. Dostupné z: doi:10.2307/1543231
- [26] MARKOVA, S. V. a E. S. VYSOTSKI. Coelenterazine-dependent luciferases. *Biochemistry (Moscow)* [online]. 2015, **80**(6), 714–732. ISSN 0006-2979, 1608-3040. Dostupné z: doi:10.1134/S0006297915060073
- [27] ANDERSON, James M. a Milton J. CORMIER. Lumisomes, the Cellular Site of Bioluminescence in Coelenterates. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1973, **248**(8), 2937–2943. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(19)44098-2
- [28] SCHENKMAYEROVA, Andrea, Martin TOUL, Daniel PLUSKAL, Racha BAATALLAH, Glwadys GAGNOT, Gaspar P. PINTO, Vinicius T. SANTANA, Marketa STUCHLA, Petr NEUGEBAUER, Pimchai CHAIYEN, Jiri DAMBORSKY, David BEDNAR, Yves L. JANIN, Zbynek PROKOP a Martin MAREK. Catalytic mechanism for Renilla-type luciferases. *Nature Catalysis* [online]. 2023 [vid. 2023-01-22]. ISSN 2520-1158. Dostupné z: doi:10.1038/s41929-022-00895-z
- [29] DIXON, Andrew S., Marie K. SCHWINN, Mary P. HALL, Kris ZIMMERMAN, Paul OTTO, Thomas H. LUBBEN, Braeden L. BUTLER, Brock F. BINKOWSKI, Thomas MACHLEIDT, Thomas A. KIRKLAND, Monika G. WOOD, Christopher T. EGGERS, Lance P. ENCELL a Keith V. WOOD. NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells. *ACS Chemical Biology* [online]. 2016, **11**(2), 400–408. ISSN 1554-8929, 1554-8937. Dostupné z: doi:10.1021/acscchembio.5b00753
- [30] ZANOTTI, G, G SCAPIN, P SPADON, J.H. VEERKAMP a J.C. SACCHETTINI. Three-dimensional structure of recombinant human muscle fatty acid-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1992, **267**(26), 18541–18550. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(19)36996-0
- [31] YOUNG, Aideen CM, Giovanna SCAPIN, Arno KROMMINGA, Sangita B PATEL, Jacques H VEERKAMP a James C SACCHETTINI. Structural studies on human muscle fatty acid binding protein at 1.4 Å resolution: binding interactions with three C18 fatty acids. *Structure* [online]. 1994, **2**(6), 523–534. ISSN 09692126. Dostupné z: doi:10.1016/S0969-2126(00)00052-6
- [32] MATSUOKA, Shigeru, Shigeru SUGIYAMA, Daisuke MATSUOKA, Mika HIROSE, Sébastien LETHU, Hikaru ANO, Toshiaki HARA, Osamu ICHIHARA, S. Roy

- KIMURA, Satoshi MURAKAMI, Hanako ISHIDA, Eiichi MIZOHATA, Tsuyoshi INOUE a Michio MURATA. Water-Mediated Recognition of Simple Alkyl Chains by Heart-Type Fatty-Acid-Binding Protein. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2015, **54**(5), 1508–1511. ISSN 14337851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.201409830
- [33] MADNI, Zaid Kamal, Sunil Kumar TRIPATHI a Dinakar M. SALUNKE. Structural insights into the lipid transfer mechanism of a non-specific lipid transfer protein. *The Plant Journal* [online]. 2020, **102**(2), 340–352. ISSN 0960-7412, 1365-313X. Dostupné z: doi:10.1111/tpj.14627
- [34] MADNI, Zaid Kamal, Amit KUMAR, Ujjwal KUMAR, Deepika JAISWAL a Dinakar M. SALUNKE. Dynamics of lipid displacement inside the hydrophobic cavity of a nonspecific lipid transfer protein from *Solanum melongena*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* [online]. 2022, 1–11. ISSN 0739-1102, 1538-0254. Dostupné z: doi:10.1080/07391102.2022.2097956
- [35] CAO, Shiyun, Shoukai KANG, Haibin MAO, Jiayu YAO, Liangcai GU a Ning ZHENG. Defining molecular glues with a dual-nanobody cannabidiol sensor. *Nature Communications* [online]. 2022, **13**(1), 815. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-022-28507-1
- [36] SCHREIBER, Stuart L. The Rise of Molecular Glues. *Cell* [online]. 2021, **184**(1), 3–9. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2020.12.020
- [37] ALTAMASH, Tausif, Wesam AHMED, Saad RASOOL a Kabir H. BISWAS. Intracellular Ionic Strength Sensing Using NanoLuc. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(2), 677. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22020677
- [38] LOENING, Andreas Markus, Anna M WU a Sanjiv Sam GAMBHIR. Red-shifted *Renilla reniformis* luciferase variants for imaging in living subjects. *Nature Methods* [online]. 2007, **4**(8), 641–643. ISSN 1548-7091, 1548-7105. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth1070
- [39] LIU, Zhi-Jie, Galina A. STEPANYUK, Eugene S. VYSOTSKI, John LEE, Svetlana V. MARKOVA, Natalia P. MALIKOVA a Bi-Cheng WANG. Crystal structure of obelin after Ca²⁺-triggered bioluminescence suggests neutral coelenteramide as the primary excited state. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2006, **103**(8), 2570–2575. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0511142103
- [40] IMAI, Yuko, Takuya SHIBATA, Shojiro MAKI, Haruki NIWA, Mamoru OHASHI a Takashi HIRANO. Fluorescence properties of phenolate anions of coelenteramide analogues: the light-emitter structure in aequorin bioluminescence. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. 2001, **146**(1–2), 95–107. ISSN 10106030. Dostupné z: doi:10.1016/S1010-6030(01)00554-8
- [41] LI, Zuo-Sheng, Xi ZHAO, Lu-Yi ZOU a Ai-Min REN. The Dynamics Simulation and Quantum Calculation Investigation About Luminescence Mechanism of Coelenteramide. *Photochemistry and Photobiology* [online]. 2013, **89**(4), 849–855. ISSN 00318655. Dostupné z: doi:10.1111/php.12073

9. SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obr. 1 Struktura molekuly koelenterazinu a schéma jeho pravděpodobné biosyntézy z tripeptidu tyrosin-tyrosin-fenylalanin, molekuly koelenteramidu a molekuly azakoelenterazinu.

Obr. 2 *Ophlophorus gracilirostris* – MNHN, Chagnoux S (2022). The crustaceans collection (IU) of the Muséum national d'Histoire naturelle (MNHN – Paris). Verze 68.288. MNHN – Museum national d'Histoire naturelle. Occurrence dataset <https://doi.org/10.15468/qgvvh> dostupný z GBIF.org on 2022-12-05. Licence CC BY 4.0. Žádné změny nebyly provedeny.

Obr. 3 Struktura molekuly furimazinu (FMZ) a furimamidu (FMA).

Obr. 4 Schéma reakce pro kinetické rovnice.

Obr. 5 Homotetramerní struktura luciferázy NanoLuc.

Obr. 6 Vazba luciferinu FMA v povrchové kavitě luciferázy NanoLuc.

Obr. 7 Vazba luciferinu CEI v povrchové kavitě tvořené homotetramerní strukturou luciferázy NanoLuc.

Obr. 8 Superpozice vazby luciferinů FMA a CEI v povrchové kavitě vytvořené homotetramerní strukturou luciferázy NanoLuc.

Obr. 9 Zobrazení rozdílu mezi otevřenou a zavřenou strukturou β -soudku.

Obr. 10 Teplotní mapa relativních aktivit jednotlivých luciferázových variant a animované zobrazení 16 substitucí udělaných v inženýrství původní luciferázy NanoLuc v kontextu asymetrického dimeru

Obr. 11 Teplotní mapa relativních luminiscenčních aktivit klíčových variant luciferázy NanoLuc a graf relativních katalytických parametrů variant D9R/K89R a D9R/K89R/H57A luciferázy NanoLuc.

Obr. 12 Emisní spektrum a emisní maxima reakce klíčových variant luciferázy NanoLuc s luciferinem FMZ a CTZ.

Obr. 13 Krystal komplexu luciferázy NanoLuc^{CTZ} a neoxidovatelné formy luciferinu azakoelenterazin.

Obr. 14 Vazba azaCTZ v katalytickém místě luciferázy NanoLuc

Obr. 15 Návrh mechanismu katalýzy luciferázy NanoLuc^{CTZ}

Tab. 1 Složky 1. PCR

Tab. 2 Průběh PCR

Tab. 3 Složky 2. PCR

Tab. 4 Seznam vytvořených mutantů luciferázy NanoLuc.

Tab. 5 Koncentrace luciferinů FMZ a CTZ pro rovnoměrné proložení křivky grafu závislosti rychlosti reakce na koncentraci substrátu.

Tab. 6 Relativní luminiscenční aktivity variant NanoLuc luciferázy měřených s CTZ a FMZ luciferiny.

Tab. 7 Teploty tání a teploty, při kterých je zagregován všechny protein, klíčových variant NanoLuc luciferázy

Tab. 8 Kinetické parametry klíčových variant luciferázy NanoLuc.