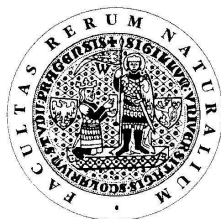


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Veronika Fojtíková

Důležité role hemu: signál pro hem-detekující proteiny
a detekční místo v plyn-detekujících proteinech

Important roles of heme as a signal and a gas-sensing site:
heme-sensing and gas-sensing proteins

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Markéta Martínková, Ph.D.

Praha 2012

Tato bakalářská práce byla podpořena z prostředků Univerzity Karlovy - projekt UNCE_204025/2012 a Grantovou agenturou České republiky - projekt P 301/10/0356.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto 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.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 11. května 2012

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce, RNDr. Markétě Martínkové, Ph.D., za zadání tohoto tématu, profesionální vedení, poskytnutou podporu, trpělivost a také čas, který se mnou strávila při zpracování mé bakalářské práce.

Abstrakt

Hem-obsahující sensorové proteiny jsou hemoproteiny, které jsou rozděleny do dvou skupin: hem-detekující a plyn-detekující proteiny. Funkce hem-detekujících proteinů je ovlivněna koncentrací hemu v okolí proteinu. Prostřednictvím navázání hemu k hem-detekujícímu proteinu (nebo naopak disociace hemu z hem-detekujícího proteinu) jsou ovlivněny mnohé fyziologické procesy v organismu, jako například regulace enzymové aktivity nebo interakce proteinu s DNA a další funkce, které jsou nezbytné pro přežití buněk. Plyn-detekující proteiny obsahují pevně vázanou molekulu hemu, ke které jsou vázány molekuly plynu (např. kyslík, oxid uhelnatý nebo oxid dusnatý) v závislosti na koncentraci molekul plynu. Navázání molekuly plynu k plyn-detekujícímu proteinu, aktivuje mechanismus, jehož prostřednictvím dochází k ovlivnění fyziologických procesů v organismu, jako například regulace enzymové aktivity nebo interakce proteinu s DNA.

V této bakalářské práci jsou shrnuty dosavadní zjištěné poznatky o těchto hemoproteinech, publikované v odborných časopisech. Experimentální část této bakalářské práce se zabývá konkrétním modelovým hem-obsahujícím sensorovým proteinem. Je jím histidin kinasa s globinovou strukturou sensorové domény, izolovaná z mikroorganismu *Anaeromyxobacter* sp., kmen Fw 109-5 (*AfGcHK*). Náplní experimentální části této bakalářské práce bylo amplifikovat a izolovat plasmid nesoucí gen pro *AfGcHK*, následně exprimovat daný gen v bakteriálních buňkách *E. coli* BL-21(DE3) a izolovat daný protein. Na základě výsledků byla navržena optimalizace izolačního postupu. Navíc byl získán vysoce purifikovaný preparát izolovaného *AfGcHK* s více než 99% homogenitou. Ve formě holoproteinu však byla jen asi 3% preparátu.

Klíčová slova: hem-obsahující sensorové proteiny; hem-detekující proteiny; plyn-detekující proteiny; hem; histidin kinasa s globinovou strukturou sensorové domény, izolovaná z mikroorganismu *Anaeromyxobacter* sp., kmen Fw 109-5 (*AfGcHK*); izolace plasmidu; exprese proteinu

Abstract

Heme-containing sensor proteins are heme proteins, which are divided into two groups: heme-sensing and gas-sensing proteins. The function of heme-sensing proteins is affected by heme availability. Association (or dissociation) of heme moiety of heme-sensing protein regulates various physiological functions, including protein kinase activity, transcription and other important functions essential for cell survival. In gas-sensing proteins, heme acts as the sensing site for binding of gaseous molecules (including O₂, NO and CO) and indirectly regulates physiological functions, including protein kinase activity, transcription and other important functions essential for cell survival.

The recent studies on heme-containing sensor proteins published in scientific journals are summarized in this thesis. The experimental part of this thesis focused on the specific heme-containing sensor protein – a globin-coupled histidine kinase from *Anaeromyxobacter* sp. strain Fw 109-5 (*AfGCHK*). The aim of this thesis was to amplify and isolate plasmid carrying gen for *AfGCHK*. Consequently the protein was expressed in *E.coli* BL-21(DE3) and the protein was isolated. Based on the results, the isolation process was optimized. Moreover, the purified preparation of isolated *AfGCHK* was prepared in more than 99% of homogeneity. However, there was only 3% of preparation in the holo-form.

Key words: heme-containing sensor proteins; heme-sensing proteins; gas-sensing proteins; heme; globin-coupled histidine kinase from *Anaeromyxobacter* sp. strain Fw 109-5 (*AfGCHK*); plasmid isolation; protein expression

(In Czech)

Obsah

Obsah	6
Seznam zkratk a symbolů.....	8
1 Teoretický úvod.....	11
1.1 Charakteristika hemoproteinů.....	11
1.2 Hem-obsahující senzorní proteiny	12
1.2.1 Hem-detekující proteiny	15
1.2.1.1 Obecné vlastnosti hem-detekujících proteinů.....	15
1.2.1.1.1 Thiolátová skupina cysteinu jako axiální ligand	15
1.2.1.1.2 Hem regulační motiv	15
1.2.1.1.3 Výměna ligandů hemu během změny redox stavu systému	16
1.2.1.1.4 Rychlost disociace hemu	17
1.2.1.1.5 Flexibilní struktura	18
1.2.1.2 Konkrétní příklad hem-detekujícího proteinu – hemem regulovaný inhibitor	19
1.2.1.2.1 Iniciační fáze translace v eukaryotické buňce a její regulace	19
1.2.1.2.2 Úloha HRI v organismu.....	20
1.2.1.2.3 Funkce HRI v onemocněních spjatých s anémií.....	21
1.2.1.2.4 Nádory plic	24
1.2.2 Plyn-detekující proteiny.....	24
1.2.2.1 Struktura a funkce plyn-detekujících proteinů	25
1.2.2.2 Kyslík detekující proteiny	25
1.2.2.2.1 PAS doména	26
1.2.2.2.2 GAF doména.....	27
1.2.2.2.3 Globinová doména.....	27
1.2.2.3 Příklady kyslík detekujících proteinů.....	28
1.2.2.3.1 HemAT	28
1.2.2.3.2 Diguanylátcyklasa s globinovou strukturou senzorní domény (YddV)	29
1.2.2.3.3 Histidin kinasa s globinovou strukturou senzorní domény izolovaná z bakterie <i>Anaeromyxobacter</i> sp., kmen Fw 109-5 (AfGcHK).....	30
2 Cíle bakalářské práce	32
3 Materiál a metody	33
3.1 Použité přístroje.....	33
3.2 Použitý materiál a chemikálie	34
3.3 Použité metody	38
3.3.1 Transformace buněk <i>E. coli</i> BL-21 (DE3) a <i>E. coli</i> DH5 α	38
3.3.2 Exprese proteinu AfGcHK	39
3.3.2.1 Kultivace buněk <i>E. coli</i> BL-21(DE3).....	39
3.3.2.2 Indukce exprese genu kódující protein AfGcHK	40
3.3.3 Izolace plasmidové DNA	40
3.3.4 Restriční analýza plasmidu pET-21c(+) endonukleasami <i>Xho I</i> a <i>Nde I</i>	42
3.3.5 Izolace proteinu AfGcHK z buněk <i>E. coli</i> BL-21(DE3)	42
3.3.6 Diskontinuální elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)	45
3.3.7 Horizontální agarosová elektroforesa	47

4 Výsledky	49
4.1 Izolace plasmidové DNA	49
4.2 Expese proteinu <i>AfGCHK</i>	52
4.2.1 Transformace buněk	52
4.2.2 Kultivace buněk <i>E. coli</i> BL-21(DE3) a expese proteinu <i>AfGCHK</i>	53
4.2.3 Kontrolní SDS elektroforesa	54
4.3 Izolace proteinu <i>AfGCHK</i> z buněk <i>E. coli</i> BL-21(DE3)	55
5 Diskuze	60
6 Závěr	64
Seznam použitých zdrojů	65

Seznam zkratk a symbolů

Názvy některých, v práci uvedených proteinů a struktur, nejsou v pravém slova smyslu zkratkou. Spíše se jedná o akronym nebo krátký triviální název. Přesto je v tomto seznamu zkratk uveden také jejich výčet.

A_{260}	absorbance při vlnové délce 260 nm
A_{280}	absorbance při vlnové délce 280 nm
AfGCHK	histidin kinasa obsahující globinovou strukturu, izolovaná z <i>Anaeromyxobacter</i> sp., kmen Fw 109-5 (kyslíkový senzor)
BIS	N,N-methylen-bis-akrylamid
bp	párů bází
c_{pDNA}	koncentrace plasmidové DNA
c-di-GMP	cyklický di-guanosinmonofosfát
CP motiv	krátká sekvence dvou aminokyselin (cysteinu a prolinu) za sebou se vyskytujících v primární sekvenci proteinů
DevS	kyslík detekující protein, obsahující GAF doménu a histidin kinasovou doménu, ovlivňuje aktivitu transkripčního faktoru DevR, se kterým tvoří dvou komponentní regulační systém
DevR	transkripční faktor, který reguluje expresi genů, v závislosti na přítomnosti kyslíku v bakterii <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , spolu s DevS nebo DosT tvoří dvou komponentní regulační systém
DosT	kyslík detekující protein, obsahující GAF doménu a histidin kinasovou doménu, ovlivňuje aktivitu transkripčního faktoru DevR
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
eIF2	eukaryotický iniciační faktor 2
eIF2B	sekundární eukaryotický iniciační faktor 2
GAF	strukturní motiv prostorového uspořádání proteinů; akronym, odvozený z anglických názvů proteinů, ve kterých se tento strukturní motiv vyskytuje: „cGMP-specific

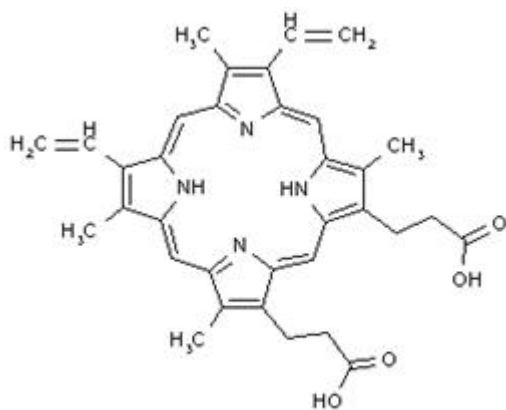
	phosphodiesterases“ , „adenyl cyclases“ a „ <i>E. coli</i> formate hydrogenlyase transcriptional activator“
GDP	guanosindifosfát
GTP	guanosintrifosfát
FixJ	substrát FixL, transkripční faktor, který reguluje expresi genů během fixace vzdušného dusíku
FixL	kyslík detekující protein s kinasovou aktivitou, který reguluje expresi genů prostřednictvím svého substrátu - FixJ
Hap 1	kyslík detekující protein, regulující expresi genů v kvasinkách
HemAT	kyslík detekující protein, který obsahuje globinovou sensorovou doménu a methyl-přijímající chemotaxní funkční doménu (hem obsahující aerotaktický transduktor)
HemAT- <i>Bs</i>	kyslík detekující protein, který obsahuje globinovou sensorovou doménu a methyl-přijímající chemotaxní funkční doménu (hem obsahující aerotaktický transduktor), izolovaný z bakterie <i>Bacillus subtilis</i>
HemAT- <i>Hs</i>	kyslík detekující protein, který obsahuje globinovou sensorovou doménu a methyl-přijímající chemotaxní funkční doménu (hem obsahující aerotaktický transduktor), izolovaný z archeonu <i>Halobacterium salinarum</i>
HRI	hemem regulovaný inhibitor
huHB	lidský hemoglobin
CheA	histidin kinasa, která je součástí dvousložkového signál převádějícího systému, který reguluje rotační směr motoru bičíku
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid
LB medium	Luria Broth medium
M	koncentrace mol l ⁻¹
mM	koncentrace mmol l ⁻¹
Met-tRNA _i	methionin transferová RNA
mRNA	mediátorová RNA
NPAS2	neuronální PAS protein 2

OD ₆₀₀	optická denzita při 600 nm
PAS	strukturní motiv prostorového uspořádání proteinů; akronym odvozený z anglických názvů tří proteinů, ve kterých se tento strukturní motiv vyskytuje: „ <i>Drosophila</i> period clock protein“, „vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ a „ <i>Drosophila</i> single minded protein“
pDNA	plasmidová DNA
PEG	polyethylen glykol
PMSF	fenylmethansulfonyl florid
RR protein	odpověď regulující protein („response regulatory protein“)
RPM	počet otáček za minutu
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného
TAE	pufr Tris-Acetát-EDTA
TB medium	Terrific Broth medium
TE	pufr Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylendiimin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
V _{vzorek}	objem vzorku
v/v	objem látky v mililitrech ve 100 ml roztoku
w/v	počet gramů látky ve 100 ml roztoku
YddV	diguanylátcyklasa s globinovou strukturou senzorové domény (kyslíkový senzor); název proteinu odvozen od názvu genu (yddv)

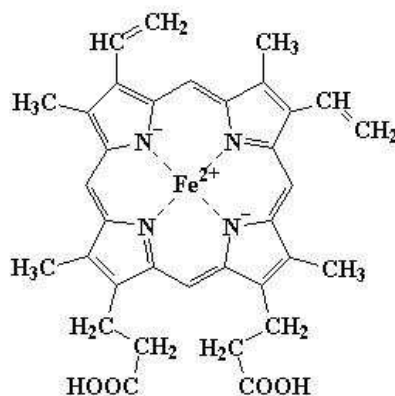
1 Teoretický úvod

1.1 Charakteristika hemoproteinů

Hemoproteiny jsou bílkoviny, obsahující jako prostetickou složku hem [1]. Hem je tvořen čtyřmi pyrrolovými kruhy, které jsou spojeny v α -polohách methinovými můstky. Tato struktura je nazývána porfin. Substituce uhlíkových řetězců ve všech β -polohách porfinu má za následek vznik derivátu porfinu, porfyriu. Podle rozložení a druhu substituentů je možné odvodit několik izomerů. V hemoproteinech se vyskytuje izomer protoporfyrin IX. V β -polohách protoporfyrinu IX se nacházejí následující substituenty: čtyři methylové skupiny, dva vinylové zbytky a dvě molekuly propionátové kyseliny [2]. Molekula protoporfyrinu IX je zobrazena na obrázku 1. Tato heterocyklická sloučenina je slabou dvojsytnou kyselinou. V alkalickém prostředí dochází k tvorbě soli, kdy jsou nahrazeny oba pyrrolové atomy vodíku iontem kovu. Vlivem chelatačního vlivu volných elektronových párů zbývajících pyrrolových atomů dusíku dochází ke stabilizaci porfyriinových solí těžkých kovů. Mezi nejstabilnější patří porfyriinové komplexy železa. V případě protoporfyrinu IX tak dochází k vytvoření ferroprotoporfyrinu IX. Tento tetrakomplex je také běžně označován výrazem hem [1]. Tato sloučenina je zobrazena na obrázku 2.



Obrázek 1: Struktura protoporfyrinu IX; převzato z [3]



Obrázek 2: Struktura hemu; převzato z [4]

Nejstabilnějšími komplexy železa jsou oktaedrické hexakomplexy. Ve výše zmiňovaných tetrakomplexech tak zůstávají dvě koordinační vazby nevysyceny. Hem je za pomoci těchto vazeb schopen snadno navázat (pomocí volných elektronových párů) jeden až dva další ligandy. Ligandem železa může být například dusík imidazolového jádra

aminokyseliny histidinu nebo thiolátová skupina aminokyseliny cysteinu. A právě spojením hemu s postranní funkční skupinou peptidového řetězce dochází ke vzniku hemoproteinů.

Hemoproteiny patří mezi látky, které vykonávají v organismech velké množství nezbytných funkcí. Z hlediska těchto funkcí se hemoproteiny rozdělují do čtyř skupin:

1. Hemoglobin a myoglobin jsou globulární bílkoviny, jejichž funkcí je transport a skladování kyslíku. Jak už bylo uvedeno dříve, iont železa obsažený v hemu je vázán na čtyři atomy dusíku a dále na dva další ligandy. V případě hemoglobinu a myoglobinu je jedním ligandem histidin F8 a druhým ligandem je molekula plynu (v případě transferu a uchovávání je touto molekulou kyslík, ale může jí být i oxid uhelnatý, a to v případě otrav tímto plynem) [2].
2. Cytochromy lze rozdělit do skupin na základě různých forem hemu, který obsahují. Příslušné formy hemu se liší v zastoupení substituentů porfyrinového kruhu, ve způsobu vazby na apoprotein nebo v redukovanosti hemu. Cytochromy se účastní transportu elektronů v dýchacím řetězci [5]. Pomocí reverzibilní změny oxidačního stupně hemového železa dochází k přenosu redukčních ekvivalentů (elektronů), které pochází z různých dehydrogenasových systémů, na kyslík.
3. Hemové enzymy katalyzují některé reakce molekulárního kyslíku (cytochrom P450) a reakce za účasti peroxidu vodíku (katalasa, peroxidasa) [2].
4. Kromě výše popsaných klasických typů hemoproteinů, kde hem slouží jako funkční centrum nebo katalytické centrum, byly objeveny nové typy hemoproteinů [6]. Hem zde působí jako zprostředkovatel dalších reakcí a není hlavním funkčním ani katalytickým centrem těchto proteinů. Tyto hemoproteiny se nazývají hem-obsahující senzorové proteiny.

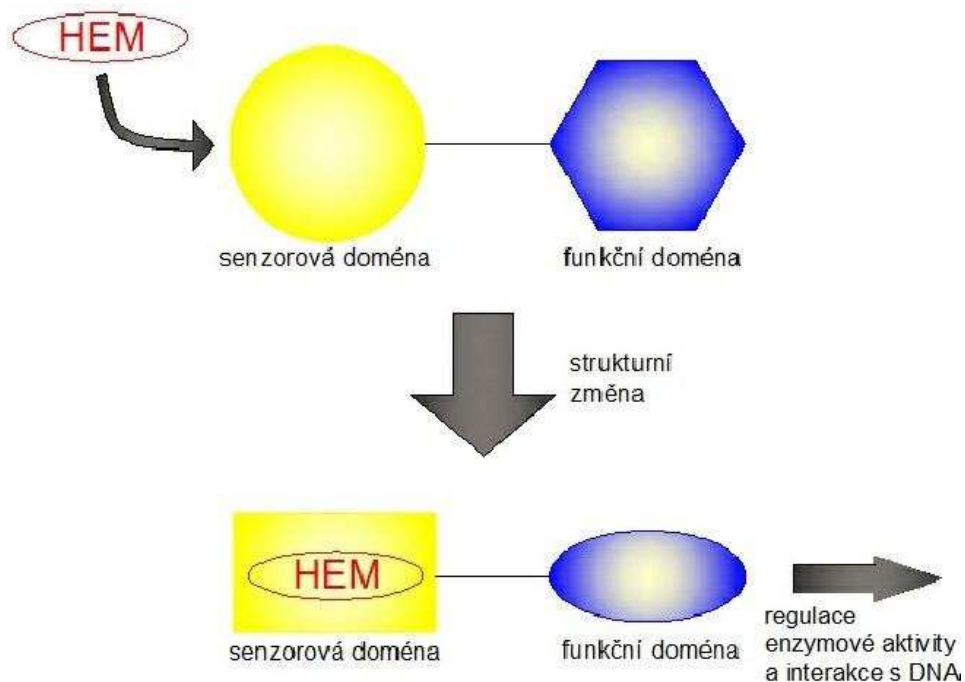
1.2 Hem-obsahující senzorové proteiny

Hem-obsahující senzorové proteiny lze rozdělit do dvou podskupin [6]. Hem-detekující proteiny a plyn-detekující proteiny.

První skupinou jsou hemoproteiny, které detekují koncentraci hemu (tj. hem-detekující proteiny). Tyto proteiny jsou tvořeny dvěma doménami - senzorovou a funkční doménou [7]. Senzorová doména obsahuje vazebné místo pro hem. Funkční

doména je ve většině známých hem-obsahujících sensorových proteinech enzymem nebo transkripčním faktorem. Pokud je v okolí hem-detekujícího proteinu zvýšená koncentrace hemu, váží se tyto molekuly na sensorovou doménu [6]. Vazba molekul hemu na sensorovou doménu způsobí strukturální změny této domény. Strukturální změna sensorové domény je signálem, který ovlivní strukturu funkční domény. Tento mechanismus zajistí aktivaci/inaktivaci funkční domény. Není pravidlem, že pokud molekula hemu je navázána, funkční doména bude aktivována. Jsou známy případy, kdy vysoká koncentrace hemu v okolí způsobí inaktivaci funkční domény.

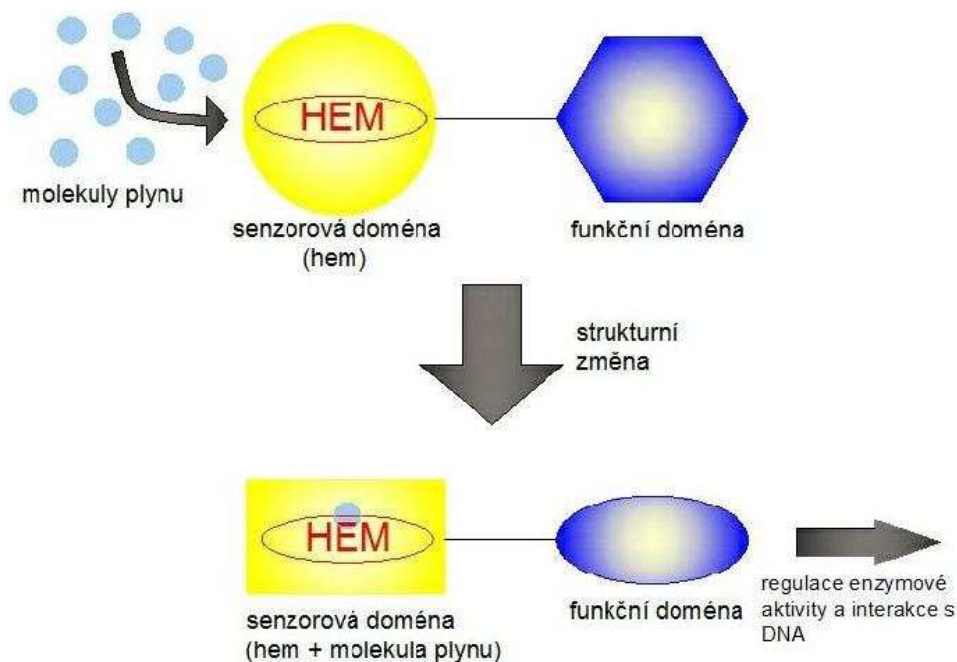
Má-li funkční doména enzymovou aktivitu, jsou po aktivaci této domény katalyzovány příslušné reakce [6]. Naopak při inaktivaci reakce katalyzovány nejsou. Pokud je funkční doménou transkripční faktor, dochází při aktivaci sensorové domény ke strukturální změně sensorové domény. Tato změna je signálem pro transkripční faktor (funkční doménu), který následně spouští nebo reguluje transkripci DNA. Mechanismus regulace hem-detekujících proteinů je znázorněn na obrázku 3.



Obrázek 3: Mechanismus regulace hem-detekujících proteinů

Molekula hemu se váže na sensorovou doménu. Tato vazba způsobí strukturální změnu této domény. Strukturální změna sensorové domény má za následek strukturální změnu funkční domény. Tato změna je signálem pro zahájení regulačních mechanismů, které funkční doména vykonává.

Do druhé skupiny hem-obsahujících sensorových proteinů náleží proteiny, které detekují koncentraci molekul plynu. Proteiny s touto funkcí se nazývají plyn-detekující proteiny [8]. Tyto proteiny obsahují také dvě domény - sensorovou doménu a funkční doménu. V případě plyn-detekujících proteinů sensorová doména obsahuje, na rozdíl od hem-detekujících proteinů, relativně pevně vázanou molekulu hemu. Molekula hemu, respektive iont železa ve středu, má nevysycenu jednu vazbu – má volnou šestou koordinační sféru (je pouze pentakoordinovaný). Vhodným ligandem pro toto vazebné místo je molekula plynu. Vyskytuje-li se molekula plynu v okolí proteinu v dostatečné koncentraci, je navázána na sensorovou doménu [9]. Tato vazba způsobí strukturní změnu sensorové domény. Strukturní změna sensorové domény má za následek strukturní změnu funkční domény. Funkční doména může mít funkci enzymu nebo transkripčního faktoru. Aktivací těchto domén je dosaženo regulace mnoha fyziologických funkcí v organismu [6]. Mechanismus regulace plyn-detekujících proteinů je znázorněn na obrázku 4.



Obrázek 4: Mechanismus regulace plyn-detekujících proteinů

Senzorová doména plyn-detekujících proteinů obsahuje pevně vázanou molekulu hemu. Molekuly plynu v okolí se váží na hem. Tato vazba způsobí strukturní změnu sensorové domény. Tato změna má za následek strukturní změnu funkční domény. Tato změna je signálem pro zahájení regulačních mechanismů, které funkční doména vykonává.

1.2.1 Hem-detekující proteiny

Činnost hem-detekujících proteinů je závislá na koncentraci hemu v jejich okolí. Hem je velmi důležitou látkou, bez které se neobejde život mnohých organismů. Jeho biosyntéza probíhá v mitochondriích a cytosolu erythroidních buněk a hepatocytů [10]. Po jeho syntéze putuje na místo spotřeby, kde je dále zabudováván do příslušných hemoproteinů (o proteinech, obsahujících hem jako prostetickou skupinu, je pojednáno v kapitole 1.1). Hem ovšem neslouží pouze jako prostetická skupina [9]. Výzkumy posledních let ukazují, že hem plní velmi fundamentální a obecně regulační roli v řadě procesů (některé z nich budou probrány v následujících kapitolách detailněji). Pro hem-detekující proteiny je velmi důležitá jeho nevázaná (volná) frakce. Koncentrace hemu v okolí hem-detekujícího proteinu je signálem pro spuštění nebo naopak zastavení důležitých reakcí v organismu [6].

1.2.1.1 Obecné vlastnosti hem–detekujících proteinů

1.2.1.1.1 Thiolátová skupina cysteinu jako axiální ligand

Jak bylo popsáno výše, většina hem-detekujících proteinů se skládá minimálně ze dvou domén (kapitola 1.2, obrázek 3, strana 13). A to ze sensorové domény a funkční domény [6]. Na sensorovou doménu se váže molekula hemu. Sensorová doména je proto speciálně vybavena pro tuto vazbu. Většina hem-detekujících proteinů využívá pro zprostředkování vazby s molekulou hemu thiolátovou skupinu cysteinu [11]. Ta je pro hem vhodným axiálním ligandem. Důvodem vhodnosti thiolátové skupiny jako axiálního ligandu je pevnost vazby hem (respektive iont železa) – thiolát, která může být ovlivněna řadou okolností. Například oxidoredukčním stavem iontu železa (viz 1.2.1.1.3) nebo okolními aminokyselinami (viz 1.2.1.1.2). V případě hem–detekujících proteinů je tato vazba relativně slabá. Je proto umožněna snadná disociace hemu (viz 1.2.1.1.4).

1.2.1.1.2 Hem regulační motiv

Během výzkumů týkajících se popisu seskupení aminokyselin sensorové domény došlo k objevu zajímavého prvku. V sekvenci aminokyselin většiny doposud objevených hem-obsahujících sensorových proteinů bylo pozorováno charakteristické uskupení aminokyselin [5]. Tím je tzv. hem regulační motiv. Hem regulační motiv je tvořen prolinem následujícím cystein v sekvenci aminokyselin (proto je také často nazýván CP

motiv) [12]. Různé hem-detekující proteiny mohou obsahovat různý počet těchto CP motivů. Například protein Hap1 (který hraje klíčovou roli v regulaci exprese v závislosti na množství kyslíku u kvasinek) obsahuje 7 CP motivů [13]. Byly provedeny pokusy, při kterých byly mutovány postupně všechny tyto CP motivy. Ze získaných výsledků vyplývá, že inaktivaci funkce Hap1 zapříčiní mutace pouze jednoho z těchto motivů. Zkoumány byly také proteiny, obsahující pouze jeden CP motiv na sensorové doméně. Během provedení pokusů s mutovaným cysteinovým zbytkem došlo k inaktivaci vazby mezi hemem a sensorovou doménou [13]. Je proto jasné, že prolinový zbytek vedle cysteinového zastává podstatnou funkci v modulaci vazby mezi thiolátovým zbytkem cysteinu a molekulou hemu. Prolinový zbytek umístěný vedle cysteinového, stericky stabilizuje cystein (a jeho thiolátovou skupinu) v určité poloze. Proto prolin usnadňuje disociaci mezi hemem a cysteinem. Tato hypotéza je založena na faktu, že nesenzorické hemové proteiny, obsahující cystein jako axiální ligand hemu, CP motiv nemají a vazba mezi cysteinem a hemovým železem má jiný charakter (například je velice pevná) [6].

1.2.1.1.3 Výměna ligandů hemu během změny redox stavu systému

U některých proteinů ze skupiny hem-detekujících proteinů byl pozorován následující jev. Pokud v buňce dochází k redoxnímu stresu, může docházet k redukci trojmocného iontu železa v molekule hemu na dvojmocný iont železa ($\text{Fe}^{\text{III}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}}$) [9]. Dvojmocný iont železa je, ve srovnání s trojmocným iontem železa, méně pozitivně nabitý. Záporně nabitá thiolátová skupina postranního řetězce aminokyseliny cysteinu bude usnadňovat disociaci redukované formy hemu s dvojmocným iontem železa. Jako typické ligandy redukované formy hemu (respektive iontu železa) se uplatňují dusík obsahující ligandy, například imidazolová struktura postranního řetězce histidinu [6]. Pokud tedy dojde ke změně oxidačního čísla hemového železa ($\text{Fe}^{\text{III}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}}$), je cystein nahrazen histidinem (popřípadě jiným vhodným ligandem obsahujícím dusík). Dochází tak ke strukturální změně sensorové domény [11]. Tato změna je dalším, dodatečným signálem pro funkční doménu. Výsledkem jsou rozdíly ve funkčnosti různých mechanismů v organismu, které tak reagují na stresové podmínky.

1.2.1.1.4 Rychlost disociace hemu

Při porovnání hodnot vyjadřujících konstantu rychlosti disociace hemu z lidského hemoglobinu (huHb) a rychlost disociace hemu z vybraných hem-detekujících proteinů lze nalézt výrazné odlišnosti. Pro účely tohoto porovnání byly zvoleny dva hem-detekující proteiny: hemem regulovaný inhibitor (HRI) a neuronální PAS2 protein (NPAS2) [6]. Hodnoty konstant rychlostí disociace hemu jsou uvedeny v tabulce 1. Z údajů vyplývá, že hodnota konstanty rychlosti disociace hemu vázaného na hem-detekující protein je výrazně větší než hodnota konstanty rychlosti disociace hemu vázaného na globin [6]. Jelikož se jedná o rozdíl hodnot v rozsahu tří řádů, je nutné tento rozdíl objasnit.

S rychlostí disociace souvisí afinita k hemu. A nízká afinita hem-detekujících proteinů k hemu je pro tyto proteiny klíčová. Změny koncentrace molekul hemu mohou mít pro organismus fatální následky. Je třeba, aby proteiny detekující množství (koncentraci) hemu v organismu nebyly hemem při jeho nízké koncentraci ovlivněny a ke vzájemné interakci docházelo až při významněji vyšší koncentraci hemu [11]. A s tímto požadavkem souvisí dříve zmiňovaná hodnota konstanty rychlosti disociace hem-detekujících proteinů. Čím je vyšší hodnota rychlosti disociace hemu, tím je afinita k hemu nižší [9]. V případě, kdy by hodnota konstanty rychlosti disociace byla nízká, afinita k hemu by byla vysoká. Hem by se tedy navázal na sensorovou doménu už při nízké koncentraci hemu v okolí hem-detekujícího proteinu. Tím by byla spuštěna kaskáda výše popsaných mechanismů (viz 1.2) a byl by aktivován regulační impuls. To je pro proteiny, zodpovědné za regulaci, nepřipustné. Hodnota konstanty rychlosti disociace hemu u hem-detekujících proteinů je tedy vysoká a jejich afinita k hemu je nízká, proto tyto proteiny mohou plnit roli hem-detekujících proteinů.

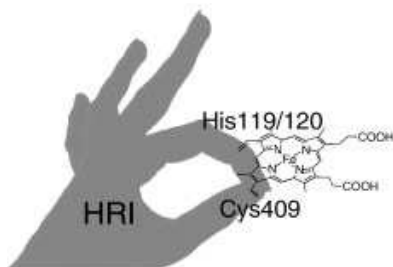
Tabulka 1: Hodnoty konstant rychlostí disociace hemu

Hem-detekující proteiny hemem regulovaný inhibitor (HRI) a neuronální PAS2 protein (NPAS2) mají, v porovnání s hodnotou konstanty rychlosti disociace hemu lidského hemoglobinu (huHb), tuto hodnotu výrazně odlišnou. Důvodem je různá afinita těchto hemoproteinů k hemu.

Hemoprotein	konstanta rychlosti disociace [s ⁻¹]	literární zdroj
HRI	1,5.10 ⁻³	[14]
NPAS2	5,3.10 ⁻³	[15]
huHb	7,1.10 ⁻⁶	[16]

1.2.1.1.5 Flexibilní struktura

Hem-detekující proteiny se odlišují od klasických typů hemoproteinů v mnoha ohledech. Jedním z nich je flexibilní struktura těchto nově popsaných proteinů [6]. U hem-detekujících proteinů je rozhodujícím faktorem vazby hemu na sensorovou doménu koncentrace hemu. Afinita hemu k těmto proteinům je však nízká, aby nedocházelo k nežádoucím vazbám hem-senzorová doména (viz 1.2.1.1.4). Jako zástupce hem-detekujících proteinů s ohledem na flexibilní strukturu byl zvolen protein HRI. Jako všechny hem-detekující proteiny i HRI je složen ze sensorové a funkční domény [17]. Během pokusu byly domény izolovány a zkoumány jako samostatné jednotky. Bylo zjištěno, že tyto dvě domény spolu v přítomnosti hemu interagují. Z této interakce vyplývá, že hem způsobí změnu proteinové struktury. Axiálními ligandy pro molekulu hemu jsou buď His119 nebo His120 na sensorové doméně a Cys409 na funkční doméně [17]. Znamená to, že molekula hemu není pevně vázána pouze na sensorové doméně (jak se dříve předpokládalo), ale je vázána oběma doménami. Na obrázku 5 je zobrazena modelová představa struktury HRI. Tento protein je zde vyobrazen jako lidská ruka, jejíž palec symbolizuje funkční doménu a ukazováček symbolizuje sensorovou doménu s příslušnými axiálními ligandy [6]. Mezi těmito dvěma prsty je umístěna molekula hemu. Bez signálu (při nízké koncentraci hemu) je ruka volně pohyblivá (flexibilní). Prahová koncentrace hemu schopná vazby na daný protein vyvolá takové konformační změny, které jsou na obrázku 5 připodobněny kontaktu palce s ukazováčkem, prostřednictvím držení molekuly hemu.



Obrázek 5: Analogie lidské ruky a flexibility proteinu HRI; převzato z [6]

Hem je k proteinu HRI vázán tak, že jeho axiální ligandy jsou na sensorové a zároveň funkční doméně. Zde je tento fakt vyjádřen modelem lidské ruky: Palec = funkční doména, ukazováček = sensorová doména. Hem je držěn palcem i ukazováčkem (hem je vázán k proteinu sensorovou i funkční doménou).

1.2.1.2 Konkrétní příklad hem–detekujícího proteinu – hemem regulovaný inhibitor

Jako zástupce skupiny hem-detekujících proteinů byl vybrán HRI, který je také známý pod názvem hemem regulovaná eukaryotický iniciační faktor 2 (eIF2) alfa kinasa [9]. Jedná se o nejvíce prostudovaného zástupce skupiny hem-detekujících proteinů. Kromě toho hraje HRI důležitou úlohu v řadě fyziologických a patologických procesů s významnými klinickými korelacemi [6].

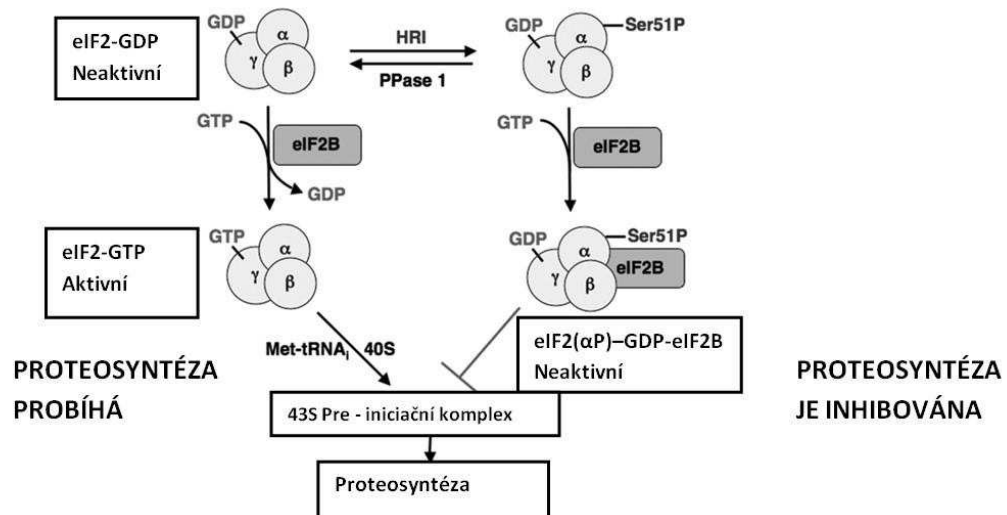
1.2.1.2.1 Iniciační fáze translace v eukaryotické buňce a její regulace

Syntéza proteinů je pro každý organismus velice důležitou a zároveň energeticky nesmírně náročnou operací [5]. Proteosyntézu proto musí mít organismus pod přísnou kontrolou, aby tento proces mohl být účelně regulován (zastaven a opět zahájen). Mezi situace, ve kterých je nutné zastavit syntézu proteinů, patří například virová infekce [18], nedostatek aminokyselin [19] nebo nedostatek hemu [20]. A právě v situacích nedostatečného množství hemu se uplatňuje regulační mechanismus, jehož součástí je hem-detekující protein HRI.

Během iniciačního kroku translace dochází k připojení Met-tRNA_i k ribozomální podjednotce 40S [21]. Toto propojení je výsledkem několika na sebe navazujících kroků. Důležitou úlohu v iniciačním kroku zastává eIF2 složený ze tří podjednotek - α , β , γ [21]. Tento protein váže GTP a Met-tRNA_i. Zároveň přenáší Met-tRNA_i na ribozomální podjednotku 40S. Sled těchto kroků části iniciační fáze translace je zobrazen na obrázku 6 v jeho levé části (strana 20). Spojením eIF2 s GDP vznikne komplex eIF2-GDP [22]. Následuje nahrazení GDP za GTP. Během fyziologických podmínek má však eIF2 400x větší afinitu ke GDP než ke GTP [21]. Ke zprostředkování této výměny je proto použit sekundární iniciační faktor eIF2B. Tento krok je velice důležitý a nezbytný pro navázání Met-tRNA_i. Vzniklý komplex eIF2-GTP-Met-tRNA_i je připojen k ribozomální podjednotce 40S za vzniku pre-iniciačního komplexu 43S [20]. Po připojení 60S ribozomální podjednotky k 43S podjednotce dochází k hydrolýze komplexu eIF2-GTP a zahájení proteosyntézy.

Pokud v organismu dochází ke stresovým situacím (jako například virová infekce [18], nedostatek aminokyselin [19] nebo nedostatek hemu [20]) jsou aktivovány mechanismy, které translaci přeruší. K přerušení translace je využíván mechanismus fosforylace eIF2 [20]. Fosforylace α podjednotky eIF2 je zajištěna kinasami. Kinas, které mají tuto funkci, existuje několik. Senzorují stresovou situaci a zahájí fosforylaci, která má

za následek pozastavení syntézy proteinů. Pokud je tedy kinasa aktivována, fosforyluje α podjednotku eIF2 [22]. Vzniklý komplex eIF2(α P)-GDP má mnohem větší afinitu k eIF2B než eIF2-GDP. Navázáním eIF2(α P)-GDP na eIF2B dojde k inaktivaci eIF2B. Není proto umožněna výměna GDP za GTP [23]. Tím nedojde k vytvoření komplexu eIF2-GTP-Met-tRNA_i a proteosyntéza je inhibována. Tento mechanismus je znázorněn na obrázku 6 v jeho pravé části.



Obrázek 6: Iniciační fáze proteosyntézy a její regulace; vytvořeno dle předlohy [23]

Aktivní eIF2-GTP přenáší Met-tRNA_i na ribozomální podjednotku 40S, za vzniku pre-iniciačního komplexu 43S a je umožněna proteosyntéza. Pokud je α podjednotka eIF2 fosforylována (na místě Ser51) dochází k inaktivaci eIF2 a proteosyntéza neprobíhá.

1.2.1.2.2 Úloha HRI v organismu

Mezi kinasy, které fosforylují α podjednotku eIF2 patří také HRI [20]. Tento hem-detekující protein je významným prostředníkem regulace syntézy proteinů v retikulocytech [17]. Aby docházelo ke správnému vytvoření molekuly $\alpha_2 \beta_2$ hemoglobinu, je nezbytné, aby koncentrace hemu a globinových řetězců byla ve správném poměru (1:1). Pokud tento poměr zachován není, nastává pro buňku nebezpečná situace. Jednotlivé samostatně se vyskytující komponenty molekuly hemoglobinu jsou pro retikulocyty a erytrocyty cytotoxické (mohou precipitovat) [20]. Aby k této situaci nedocházelo, nachází se v retikulocytech ve velkém množství HRI. Tento hemem regulovaný inhibitor je zodpovědný za regulaci množství nasyntetizovaných α a β globinových řetězců v závislosti na množství hemu obsaženého v buňce [20].

Pokud se v retikulocytech vyskytuje dostatečná koncentrace hemu, molekula hemu se váže na HRI. Tím dochází k zablokování kinázové aktivity HRI a eIF2 není aktivovaný [24]. Tím pádem probíhá proteosyntéza a tvoří se nové řetězce proteinů. Pokud je koncentrace hemu nedostatečná, dochází nejprve k autofosforylaci HRI. Autofosforylace chrání HRI před agregací a stabilizuje protein pro plnou funkční (kinasovou) aktivitu. Aktivovaná molekula HRI je schopna fosforylovat eIF2 na místě Ser51 a výše popsanými reakcemi (viz 1.2.1.2.1) dochází k inaktivaci proteosyntézy [24].

1.2.1.2.3 Funkce HRI v onemocněních spjatých s anémií

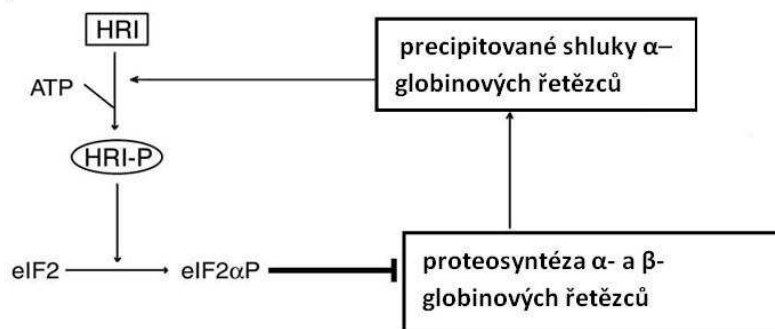
Vzhledem k výše popsané roli HRI v kontrole syntézy globinů v retikulocytech je logické, že HRI bude zastávat funkci také v patologických procesech determinovaných poruchou syntézy globinů a hemu. HRI je proteinem, který je nezbytným prvkem v ochraně organismu před fatálními následky různých forem anémií. Jedná se o sideropenickou anémii [24], β -thalasemii [25] a erythropoetickou protoporfyrii [26].

Sideropenická anémie patří celosvětově mezi velmi častá onemocnění. Toto onemocnění je způsobeno nedostatečným množstvím iontů železa v organismu [27]. V lidském organismu je největší podíl iontů železa součástí hemu v hemoglobinu a dalších hemoproteinech (myoglobinu, cytochromech atd.). Určitý podíl iontů železa je vázán na tkáňový protein feritin. Minimální část iontů železa v organismu se vyskytuje jako volná frakce v krvi. Nedostatek iontů železa v lidském organismu může být způsoben nedostatečným příjmem iontů železa v potravě, zvýšenou utilizací železa nebo při větších ztrátách železa (například při nehodách, dárcovství krve) [28].

Za normálních podmínek při sideropenické anémii dochází k mikrocytóze a hypochromii. Při těchto adaptacích organismu na nedostatek železa dochází k poklesu objemu erytrocytů a klesá koncentrace hemoglobinu v erytrocytech [27]. Bylo zjištěno, že za tyto adaptace je zodpovědný HRI [24]. Nedostatek molekul železa má za následek také nedostatek molekul hemu. Jak bylo uvedeno dříve, ke správné funkci a správnému vzniku molekuly hemoglobinu je nezbytné zachování poměru globinových řetězců a molekul hemu. Za stavu, kdy jsou globinové řetězce v nadbytku, by docházelo k jejich precipitaci. To by vedlo až k destrukci buněk. Proto je v těchto situacích aktivována molekula HRI, která zastaví syntézu globinových řetězců pomocí stejného mechanismu jako při nedostatku hemu [24].

β -thalasemie je dědičné onemocnění, rozšířené po celém světě. Tato choroba způsobuje anémii, neboť je narušena syntéza β -globinových řetězců [28]. α -řetězce jsou syntetizovány správně, jsou tak oproti méně syntetizovaným β -řetězcům v nadbytku. Po vytvoření molekuly hemoglobinu se v buňce vyskytuje nadbytek volných α -globinových řetězců, které precipitují, a tím způsobují narušení retikulocytů v kostní dřeni. Výsledkem neúměrné tvorby globinových řetězců je anémie [28]. K β -thalasemii může docházet všemi známými poruchami mechanismu proteosyntézy, jako například delecí části β -globinového genu, mutací sestřihového místa mRNA, mutací promotoru a jiných [29]. Byly provedeny pokusy s geneticky modifikovanými myšmi, kdy první skupina myší neměla ve své genetické výbavě kopii genu pro HRI a druhá skupina tuto kopii ve své výbavě měla [25]. U obou skupin byl inaktivován gen pro β -globin. Potíže, způsobené β -thalasemií, měly mnohem horší dopad u jedinců první skupiny (deficitních na protein HRI). Z tohoto experimentu lze usuzovat, že protein HRI hraje důležitou roli ve zmírnění následků defektní proteosyntézy β -globinových řetězců. Nadbytek precipitovaných shluků α -globinových řetězců aktivuje HRI, který je autofosforylován. Takto aktivovaný HRI prostřednictvím své kinázové aktivity způsobí zastavení proteosyntézy a tedy i syntézy α -globinových řetězců. Tím zajistí, aby se v buňce tyto globinové řetězce již dále nehromadily a nedocházelo k destrukci retikulocytů a následně erytrocytů. Sled kroků vedoucích k zastavení syntézy α -globinových řetězců je zobrazen na obrázku 7 [25].

β - thalasemie



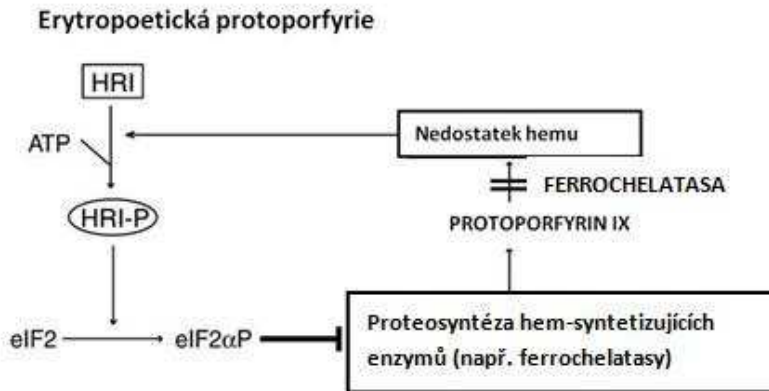
Obrázek 7: Potlačení syntézy α -globinových řetězců pomocí hemem regulovaného inhibitoru (HRI); vytvořeno dle předlohy [25]

Nadbytek precipitovaných shluků α -globinových řetězců je signálem pro HRI. Ten je pomocí autofosforylace aktivován a fosforyluje eIF2, čímž zastaví syntézu α - a β -globinových řetězců.

Erytropoetická protoporfyrie je způsobena mutacemi v genu kódujícím enzym ferrochelatasu [28]. Tento enzym, lokalizovaný v mitochondriích, umožňuje spojení iontu železa s protoporfyrimem IX během hemové syntézy [10]. V případě, kdy je enzym ferrochelatasu nefunkční, dochází k hromadění protoporfyriu IX primárně v erytrocytech, sekundárně pak v játrech, kůži, plazmě a stolici. Postižení pacienti trpí svědivou a velmi bolestivou fotodermatózou. V ojedinělých případech může vlivem nahromadění protoporfyriu IX docházet k selhání jater [28,30].

Také u tohoto onemocnění bylo předpokládáno, že se HRI pravděpodobně účastní regulačních mechanismů. Proto, jako u výše zmíněného onemocnění β -thalasemie, byly provedeny analogické pokusy s geneticky modifikovanými modelovými organismy. Opět byly vytvořeny dvě skupiny myši, jedna skupina s chybějící kopií genu pro HRI a druhá skupina s úplnou genovou výbavou pro protein HRI [25]. Obě tyto skupiny měly mutovaný gen pro ferrochelatasu. Tato mutace vedla k prudkému poklesu enzymové aktivity ferrochelatasu a tedy k výrazně nižšímu množství syntetizovaného hemu a hromadění protoporfyriu IX. Bylo zjištěno, že myši se správně fungujícím HRI vykazují mikrocytickou hypochromní anémii, zatímco myši patřící do skupiny s nefunkčním HRI byly mnohem více anemické [25].

Pomocí elektronové mikroskopie byly v retikulocytech skupiny s chybějícím proteinem HRI odhaleny shluky precipitovaných globinových řetězců. Ty se v retikulocytech vyskytují díky nedostatku hemu a trvající globinové syntéze při absenci HRI. Ve skupině myši s chybějícím HRI bylo pozorováno mnohem větší množství protoporfyriu IX v erytrocytech a retikulocytech než u myši s funkčním HRI. Z experimentů provedených dříve vyplývá, že protoporfyrim IX má mnohem menší schopnost inhibice proteosyntézy než hem [25]. Z toho zjištění lze usoudit, že nižší podíl syntézy protoporfyriu IX v organismech s HRI, je pravděpodobně zapříčiněn inhibicí translace proteosyntézy enzymů syntetizujících protoporfyrim IX. V tomto případě tedy HRI neovlivňuje pouze syntézu globinových řetězců v retikulocytech, ale také translaci enzymů syntetizujících hem [25]. HRI je proto zodpovědný za to, aby nedocházelo k nahromadění toxického protoporfyriu IX v krevních buňkách. Tato situace je znázorněna na obrázku 8 (strana 24).



Obrázek 8: Potlačení syntézy hemu pomocí hemem regulovaného inhibítora (HRI); vytvořeno dle předlohy [25]

Vzniklý protoporfyrin IX nemůže interakcí s molekulou železa vytvořit molekulu hemu, kvůli chybějící aktivitě enzymu ferrochelatasy. Nedostatek hemu vyvolá autofosforylaci molekuly HRI. Tato fosforylace pomocí dalšího sledu událostí zabrání syntetizování enzymů, které se účastní syntézy hemu. A tím je v konečném důsledku potlačena nadměrná syntéza protoporfyrinu IX.

1.2.1.2.4 Nádory plic

V posledních letech byly zjištěny nové funkce proteinu HRI v organismu. Zdá se, že role hemu a HRI je mnohem fundamentálnější, než se zprvu zdálo. Systematická sekvenace genomu vybraných nádorových buněk vedla k identifikaci nových genů, zapojených do procesu nádorového bujení [31]. Bylo zjištěno, že pacienti s nádorem plic, mají v této tkáni mutovaný HRI (Gly202 je nahrazen Ser). Tato mutace může být významná pro rozvoj rakoviny daného orgánu [31].

Cílem výzkumu laboratoře, ve které byla vypracována tato bakalářská práce, je porozumět a vysvětlit funkci hem-detekujících proteinů (speciálně HRI) v různých klinických stavech. Nejdříve je ale třeba prozkoumat molekulární mechanismy působení těchto proteinů. V tomto ohledu je důležité nalézt vhodné modelové proteiny, které usnadní studium obecných mechanismů funkce hem-obsahujících sensorových proteinů.

1.2.2 Plyn-detekující proteiny

Druhou skupinou hem-obsahujících sensorových proteinů jsou plyn-detekující proteiny [9]. S objevem těchto proteinů, nacházejících se v různých buňkách od buněk bakterií až po buňky člověka, byly zodpovězeny některé otázky. Například jakým

způsobem organismus reaguje na změny koncentrací plynů jak pro něj toxických, tak těch, bez kterých se jeho život neobejde [32].

1.2.2.1 Struktura a funkce plyn-detekujících proteinů

Plyn-detekující proteiny jsou složeny ze dvou domén (obrázek 4, kapitola 1.2, strana 14) [9]. První částí proteinu je sensorová doména. V této doméně je vázána prostetická skupina hemu. Na rozdíl od hem-detekujících proteinů, kdy je důležité, aby k disociaci hemu docházelo rychle a afinita k hemu byla nízká, je v plyn-detekujících proteinech hem vázán k proteinu relativně silně. Pevnost vazby hem-protein je srovnatelná s pevností této vazby v hemoglobinu nebo myoglobinu. Důvod pevnosti této vazby je prostý. Hlavním úkolem této prostetické skupiny v plyn-detekujících proteinech je vázat molekuly plynu. Protože tyto proteiny detekují plynné molekuly, musí být (na rozdíl od hemoglobinu nebo myoglobinu) afinita hemu k plynům nízká. Hem proto musí mít vysokou afinitu k proteinu, aby mohl vázat molekuly plynu a tím byl příslušný plyn proteinem detekován. Sensorová doména je tedy detekční oblastí.

Druhou oblastí plyn-detekujících proteinů je funkční doména [9]. Úkolem plyn-detekujících proteinů je, v závislosti na koncentraci molekul plynu, vyvolat signál. Prostřednictvím tohoto signálu dochází k ovlivnění významných funkcí v buňce. Mechanismus tohoto úkolu je následovný. Molekula plynu je navázána (nebo naopak disociuje) na prostetickou skupinu na sensorové doméně. Tato situace způsobí strukturní změnu sensorové domény, která je zaznamenána jako signál funkční doménou. Aktivovaná funkční doména signál převede na biochemické reakce jako například aktivace transkripce (interakce protein – DNA), změna enzymové aktivity a další [6,9]. Tento mechanismus je znázorněn na obrázku 4 (strana 14). Mezi molekuly plynu, které jsou detekovatelné těmito proteiny, patří kyslík, oxid dusnatý a oxid uhelnatý. Na základě typu molekuly plynu jsou plyn-detekující proteiny rozdělovány na kyslík detekující, oxid dusnatý detekující a oxid uhelnatý detekující. Vzhledem k tomu, že experimentální část této bakalářské práce se týká kyslík detekujícího proteinu, bude kladen důraz na popis kyslík detekujících proteinů.

1.2.2.2 Kyslík detekující proteiny

Pro kyslík detekující proteiny je typická vzájemná kombinace různých druhů strukturních motivů sensorové a funkční domény [9]. Na místě sensorové domény se uplatňují v zásadě tři různá prostorová uspořádání - PAS doména, GAF doména a

globinová struktura. Na základě těchto uspořádání byly kyslík detekující proteiny rozděleny do tří skupin. Naproti tomu na místě funkční domény lze nalézt větší zastoupení různorodých struktur. Mezi struktury mající enzymovou aktivitu patří kinasy, diguanylátcyklasa, fosfodiesterasa. Funkční doména může mít také funkci transkripčního faktoru [9].

1.2.2.2.1 PAS doména

PAS je akronym odvozený z anglických názvů tří proteinů, ve kterých byl tento strukturní motiv objeven [33]. Těmito třemi proteiny jsou: „*Drosophila* period clock protein“, „vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ a „*Drosophila* single minded protein“. PAS doména tvoří sensorové domény v různých signalizačních proteinech a spolupracuje s různými funkčními doménami (např. histidin kinasy, serin/threonin kinasy). PAS doména je detekčním místem, které hlídá změny ve vstupním signálu, kterým může být například změna v redoxním potenciálu, světlo nebo změna v koncentraci molekuly kyslíku [33]. A právě PAS doména, která detekuje změnu v koncentraci kyslíku, je strukturním motivem sensorové domény kyslík detekujících proteinů. Nejlépe prozkoumanými proteiny obsahující PAS domény, jsou ty, které zachycují signál pomocí kofaktorů [9]. V případě všech doposud objevených kyslík detekujících proteinů, je tímto kofaktorem PAS domény molekula hemu [9]. Jako příklad kyslík detekujícího proteinu s kinasovou aktivitou, který obsahuje PAS doménu, bude v následujícím textu uveden protein FixL. Substrátem tohoto proteinu je transkripční faktor FixJ, který reguluje expresi genů během fixace vzdušného dusíku.

FixL protein je prvním identifikovaným plyn detekujícím enzymem [34]. Jeho úkolem je, v závislosti na množství kyslíku, regulovat expresi genů. Gramnegativní bakterie *Shinorhizobium meliloti*, patřící k rodu *Rhizobium*, tedy k rodu bakterií, vázající vzdušný dusík, potřebuje ke svému přežití mechanismus detekující množství kyslíku v jejím okolí [35]. K fixaci vzdušného dusíku bakterie využívá nejméně 23 genů, které jsou exprimovány v závislosti na nepřítomnosti kyslíku [36]. Pokud se v okolí vyskytuje kyslík, dochází k inaktivaci enzymů, které jsou nezbytné k provedení fixace dusíku. FixL protein je zodpovědný za signál, oznamující organismu, že koncentrace vzdušného kyslíku je nízká, a je tak možné exprimovat geny pro fixaci dusíku.

Mechanismus je následovný. Pokud kyslík v okolí není, není navázán na hemovou část PAS domény (sensorovou doménu) FixL proteinu [36]. Tím se změní struktura

senzorové domény a signál je tak přenesen na funkční doménu. V případě proteinu FixL vykazuje funkční doména kinasovou aktivitu. Její aktivaci je tak fosforylován transkripční faktor FixJ, čímž dochází k jeho aktivaci. Aktivovaný FixJ zvyšuje expresi genů pro fixaci dusíku.

1.2.2.2.2 GAF doména

GAF je akronym, odvozený z anglických názvů proteinů, ve kterých se tato doména vyskytuje [37]. Jsou to proteiny: „cGMP - specific phosphodiesterases“, „adenyl cyclases“ a „*E. coli* formate hydrogenlyase transcriptional activator“. GAF domény se liší svou primární strukturou od PAS domén. Prostorová struktura těchto dvou domén je však homologní [9]. GAF domény jsou běžně se vyskytující součástí mnohých signalizačních a detekujících proteinů. Stejně jako PAS domény i GAF domény detekují koncentraci kyslíku pomocí kofaktoru, kterým je molekula hemu.

Zástupci proteinů, které využívají GAF domény s hemovým kofaktorem v jeho senzorové doméně, jsou proteiny, vyskytující se v bakterii *Mycobacterium tuberculosis* [4]. Tato bakterie je obligátně aerobní [35]. Pokud nastane situace, kdy je v okolí nízká koncentrace kyslíku, bakterie ukončí expresi určitých genů. Tato regulace je zprostředkována pomocí transkripčního faktoru DevR [38]. Aktivita toho transkripčního faktoru je řízena pomocí senzorových proteinů DosT a DevS. Oba tyto proteiny obsahují dvě GAF domény s molekulou hemu jako kofaktor (senzorová doména) a histidin kinasovou doménu (funkční doména) [38]. Pokud je v okolí bakterie dostatečné množství molekul kyslíku, jsou hemové části GAF domény proteinů DosT a DevS saturovány kyslíkem. Kinasová aktivita funkční domény, která je spjata s transkripčním faktorem DevR je potlačena. Pokud v okolí není dostatečné množství molekul kyslíku, není molekula kyslíku vázána na hem GAF domény (senzorová doména). Tím dochází k autofosforylaci funkční domény, což se podílí na přenosu fosfátu na transkripční faktor DevR. DevR tak zahájí syntézu genů, které umožní buňce adaptaci na hypooxygenní situaci [38].

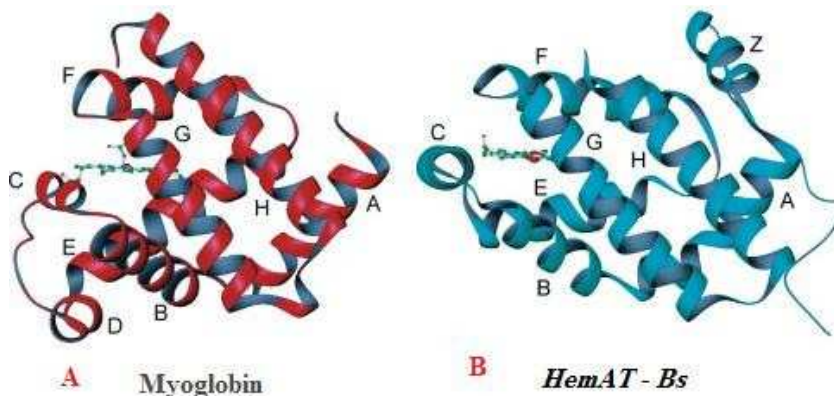
1.2.2.2.3 Globinová doména

Struktura globinové domény se svou prostorovou strukturou výrazně liší od 3D struktury PAS a GAF domén [39]. Globinová struktura vykazuje vysokou homologii se

strukturou hemoglobinu a myoglobinu (viz obrázek 9).

Primární struktura molekuly globinu je dána pořadím aminokyselin [2]. Sekundární je tvořena 8 α -helixy (označovanými A – H), které jsou spojeny krátkými segmenty a tvoří elipsoidní molekulu. Terciální struktura udává prostorové uspořádání jednotlivých 8 α -helixů v prostoru [10]. V případě globinu se jedná o vzájemné polohy jednotlivých α -helixů vůči sobě.

Jako první byla globinová doména popsána u hem obsahujícího aerotaktického transduktoru (HemAT), který je syntetizován bakterií *Bacillus subtilis* [9]. Jeho globinová sensorová doména je složena z 8 α -helixů s jedním prodlouženým řetězcem. α -helixy byly pojmenovány podle nomenklatury homologní globinové struktury hemoglobinu (myoglobinu). Jak je patrné z obrázku 9, je v sensorové doméně proteinu HemAT-*Bs* v porovnání s myoglobinem před helixem A umístěn jiný helix [40]. Tento helix byl pojmenován Z. Dalším rozdílem při porovnání těchto globinů, je chybějící D helix ve struktuře sensorové domény proteinu HemAT-*Bs*.



Obrázek 9: porovnání struktury myoglobinu a sensorové domény proteinu HemAT-*Bs*, převzato z [40]

3D struktura myoglobinu (A) s 3D strukturou sensorové domény proteinu HemAT-*Bs* (B). Tyto dvě struktury jsou homologní a liší se od sebe výrazněji pouze v lokalizaci helixu Z a D.

1.2.3.3 Příklady kyslík detekujících proteinů

1.2.3.3.1 HemAT

Podle typu organismu, ve kterém byl protein HemAT studován, je rozlišován HemAT-*Hs* (*Halobacterium salinarum*) a HemAT-*Bs* (*Bacillus subtilis*). Tyto proteiny jsou složeny ze sensorové globinové domény a funkční domény, která je velmi podobná doméně methyl-přijímajícího chemotaxního proteinu bakteriálních chemoreceptorů [9]. Sensorová globinová doména je zodpovědná za vazbu kyslíku, nacházejícího se v okolí,

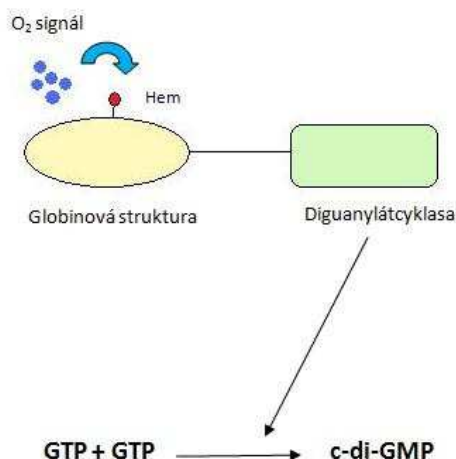
zatímco funkční doména interaguje s histidin kinasovým proteinem Che A. Ten je součástí dvousložkového signál převáděcího systému, který reguluje rotační směr motoru bičíku [41]. Tento signál převáděcí systém je velmi složitý, funkce jeho jednotlivých složek je intenzivně studována.

HemAT-*Bs* je jedním z mála hem-obsahujících sensorových proteinů, u kterého je známa alespoň struktura sensorové domény (tato struktura je zobrazena na obrázku 9B, strana 28) [41].

1.2.2.3.2 Diguanylátcyklasa s globinovou strukturou sensorové domény (YddV)

Protein YddV byl pojmenován podle názvu genu, který jej kóduje (*yddv*). Tento gen byl objeven systematickou sekvenací genomu bakterie *Escherichia coli*. V té době nebyla známá jeho funkce, byl proto pojmenován systematickým názvem *yddv*.

Protein YddV izolovaný z bakterie *Escherichia coli* zastává důležitou úlohu v syntéze cyklického di-guanylmonofosfátu (c-di-GMP) (viz obrázek 10, strana 30). c-di-GMP vzniká ze dvou molekul GTP za účasti diguanylátcyklasy [2]. V případě nepříznivých podmínek jsou mnohé bakterie schopny přejít do stavu nazývaného biofilm. V tomto stádiu vykazují odlišné fyziologické a morfologické znaky oproti běžnému stavu [42]. Také exprese genů je rozdílná. Pro buňky nacházející se ve stadiu biofilmu je charakteristická produkce adhezivních látek a extracelulárních polysacharidů. Tyto polysacharidy způsobují větší odolnost daných bakterií k nepříznivým environmentálním podmínkám. Mají také větší rezistenci k antibiotikům. Přechod do stádia biofilmu je regulován pomocí signální molekuly, v tomto případě pomocí výše zmíněného c-di-GMP. Protein YddV bakterie *E. coli* je složen ze sensorové domény globinového typu a diguanylátcyklasové (funkční) domény [42]. Molekula kyslíku je tedy signálem pro spuštění kaskády mechanismů, která vyústí v aktivaci diguanylátcyklasy. Tím pádem je možno za účasti molekul GTP syntetizovat cyklický di-guanylmonofosfát, který hraje stěžejní roli při vzniku biofilmu a produkci polysacharidů. Tento mechanismu je znázorněn na obrázku 10 (strana 30).



Obrázek 10: Mechanismus syntézy c-di-GMP prostřednictvím diguanylátcyklasy s globinovou strukturou sensorové domény (YddV)

Molekula kyslíku interaguje s prostetickou skupinou globinové struktury proteinu YddV. Tím vzniká signál, který aktivuje funkční doménu proteinu YddV. Tato doména je tvořena diguanylátcyklasou, tedy enzymem, který katalyzuje syntézu c-di-GMP ze dvou molekul GTP.

1.2.2.3.3 Histidin kinasas s globinovou strukturou sensorové domény izolovaná z bakterie *Anaeromyxobacter sp.*, kmen Fw 109-5 (*AfGcHK*)

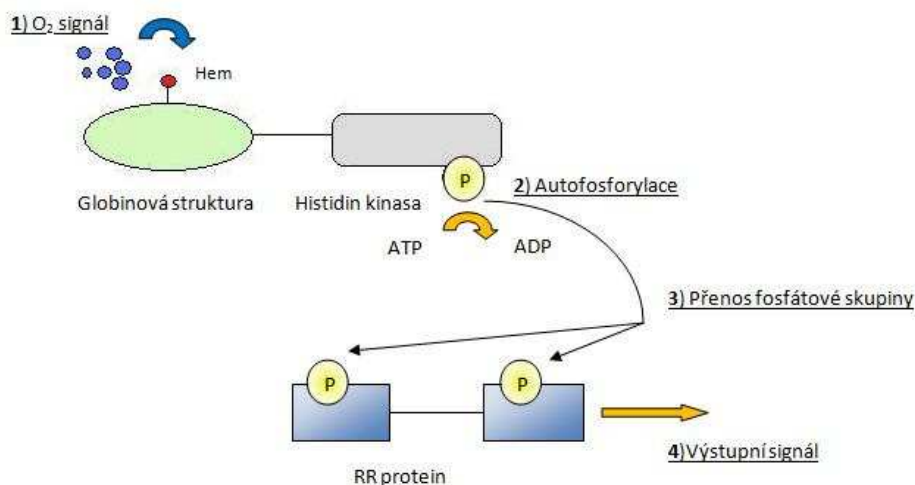
AfGcHK je protein, který byl izolován z půdní bakterie *Anaeromyxobacter sp.*, kmene Fw 109-5 [39]. Sensorová doména tohoto proteinu je tvořena globinovou strukturou a funkční doména je tvořena enzymem histidin kinasou. Jeho mechanismus působení využívá dvousložkový signál převádějící systém. Tím je převodní systém funkční doména (histidin kinasas) - odpověď regulující („response regulatory“) protein (RR protein). Vazba molekuly kyslíku k molekule hemu (respektive iontu železa) způsobí konformační změnu sensorové domény (globinová struktura). Je předpokládáno, že se zároveň změní i konformace funkční domény (histidin kinasas), která je tak aktivována. Substrátem pro enzym histidin kinasas může být funkční doména sama o sobě (dochází tedy k autofosforylačnímu procesu) nebo je substrátem RR protein. Aktivovaný fosforylovaný RR protein zahájí kaskádu dalších procesů (viz obrázek 11, strana 31) [39]. Funkce RR proteinu zatím není plně objasněna. Je však intenzivně studována a je předpokládáno, že se podílí na regulaci procesů, jakými jsou virulence nebo tvorba biofilmu [43].

Po identifikaci a izolaci proteinu *AfGcHK* byly provedeny pilotní studie, vedoucí k získání informací o jeho struktuře a dalších charakteristických vlastnostech [39]. Studován byl jak protein ve své původní formě (wild - type), tak také jeho mutované formy. Pomocí fyzikálně – chemických vlastností mutovaného enzymu bylo zjištěno, že axiálním ligandem hemu je His99 na proximální straně, zatímco na distální straně

umístěný Tyr45 vytváří elektrostatické interakce s kyslíkem vázaným jako axiální ligand hemu.

Pomocí absorpční spektrometrie byly stanoveny údaje o optických vlastnostech proteinu *AfGcHK* (FeIII), kdy poměr protein: hem byl 1:1 [39]. Soretův pás této formy proteinu byl nalezen v oblasti 411 nm [39]. Spektrum tohoto Fe(III) komplexu bylo stabilní v rozmezí hodnot pH 7,0 – 10,0 [39]. Při pH nižším než 6,0 docházelo k tvorbě precipitátů. Toto zjištění bylo předpokladem pro teorii, že axiálním ligandem Fe(III) na distální straně je OH⁻. Komplex Fe(II)–O₂ byl velmi stabilní. Spektrum tohoto komplexu nepodléhalo žádným změnám a to ani po ponechání tohoto komplexu tři dny při laboratorní teplotě [39].

Komplexy proteinu s Fe(III), Fe(II)-O₂ a Fe(II)-CO vykazovaly autofosforylační aktivitu a tedy aktivaci funkční domény. Na rozdíl od komplexu s Fe(II), u kterého nedocházelo ke změně globinové struktury a tento komplex tak nebyl schopen ani autofosforylace, ani fosforylace RR proteinu [39]. Během pokusů zkoumajících, která aminokyselina je fosforylována během autofosforylace, byla na základě předchozích výzkumů, provedena mutace His183 [39]. Fe(III) a Fe(II)–O₂ komplexy s touto mutací ztratily svou autofosforylační aktivitu. Je proto předpokládáno, že autofosforylačním místem proteinu *AfGcHK* je His183.



Obrázek 11: Mechanismus aktivace odpověď regulujícího proteinu (RR proteinu) pomocí proteinu histidin kinasy s globinovou strukturou senzorové domény izolované z bakterie *Anaeromyxobacter* sp., kmen Fw 109-5 (*AfGcHK*)

Molekula kyslíku se váže jako axiální ligand k hemu na globinové struktuře (1). Tím je aktivována histidin kinasa (funkční doména), která má schopnost fosforylovat sama sebe (autofosforylace) (2). Tím je tato doména ještě více aktivní a fosforyluje RR protein (3). Takto aktivovaný RR protein ovlivňuje další funkce v buňce (4).

2 Cíle bakalářské práce

- Primárním cílem této bakalářské práce bylo shrnutí dosavadních poznatků publikovaných v odborných časopisech, o hem-obsahujících sensorových proteinech se zaměřením na plyn-detekující proteiny.
- Dalším cílem byla amplifikace a izolace plasmidu pET-21c(+)/*AfGcHK* v buňkách *Escherichia coli* DH5 α s následnou charakterizací izolovaného plasmidu.
- V neposlední řadě bylo úkolem bakalářské práce transformovat buňky *E. coli* BL-21(DE3) plasmidem pET-21c(+)/*AfGcHK* a exprimovat protein *AfGcHK* v těchto buňkách.
- Finální náplň bakalářské práce pak spočívala v izolaci exprimovaného proteinu *AfGcHK* z buněk *E. coli* BL-21(DE3), jeho purifikaci pomocí afinitní chromatografie a následné pilotní charakterizaci izolovaného proteinu *AfGcHK*.

3 Materiál a metody

3.1 Použité přístroje

Analytické váhy:	HM-200, A&D Instruments LTD
Autokláv:	Varioklav 400E, H+P Labortechnik
Bezdotykový kahan:	Gasprofi2 SCS, VLD-TEC
Centrifuga:	5415 R, Eppendorf Allegro X-22R, Beckman Coulter Janetzki K 70 D, MLW Stolní minicentrifuga Gilson, GmC Lab
Elektrický ohřívač:	ETA
Elektroforetická aparatura:	miniVE Vertical, Amersham Biosciences MSMINI 10-Multi Sub Mini, Uvitec
Inkubátor:	IR 1500 Automatic CO2 Incubator, Flow Laboratories
Laminární box:	BIO 126, Labox
Magnetická míchačka:	KMO2 basic, IKA
Předvážky:	EK-600H, A&D Instruments LTD
Spektrofotometr:	Spekol 11, CARLZEISS, Jena NanoVue™ Plus Spectrophotometer, GE Healthcare Bio-Sciences AB Diod Array 8453, Hewlett-Packard
Transiluminátor:	Dark Reader, Clare Chemical Research
Třepačka:	Mini Rocker MR-1, BioSan
Orbitální shaker:	ORBI-SAFE TS Net Wise, Gallenkamp
Ultrazvuková sonda:	Sonopuls HD 3100, sonda KE 76, Bandelin
Vakuová odparka:	Speed Vac, DNA 110, Savant
Vodní lázeň:	Julabo TW2, Biotech
Zdroj pro elektroforesu:	EPS 301, Electrophoresis Power Supply, Amersham Pharmacia Biotech

3.2 Použitý materiál a chemikálie

OXOID LTD, Anglie

- Tryptone, Yeast extract

Penta, ČR

- Hydrogen fosforečnan didraselný, glycin, glukosa, dithioničtan sodný

LACHEMA BRNO, ČR

- Dihydrogenfosforečnan draselný, persíran amonný, ethanol, ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), isopropanol, octan sodný

SIGMA, USA

- Isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG), Luria Agar, Luria Broth (LB) medium, dimethylsulfoxid (DMSO), polyethylen glykol (PEG)

Fluka, Švýcarsko

- Dodecylsíran sodný (SDS), akrylamid, N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), merkaptoethanol, fenylmethansulfonyl florid (PMSF), lysosym, tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)

SERVA Elektrophoresis, Německo

- N, N, N', N'-tetramethylethylendiimin (TEMED), Coomassie Brilliant Blue R-250, ampicilin

Lach-Ner, ČR

- Kyselina octová, glycerol

Erba Lachema, ČR

- Chlorid sodný, bromfenolová modř

Linde, ČR

- Dusík (g)

Fermentas, Kanada

- λ DNA/EcoRI + HindIII marker, Marker SpectraTM Multicolor Broad Range Protein Ladder, RNasa A

Pharmacia, Švédsko

- Agarosa

INVITROGEN, USA

- SYBR Safe™ DNA Gel Stain

NEW ENGLAND BioLabs, USA

- *NdeI*, *XhoI*, NEB4 Pufř (složení viz 3.3.4)

Clontech, USA

- TALON® Metal Affinity Resin

Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Německo

- Spectra Pore Visking Dialysis Tubing, Type 20/32

Stratagen, USA

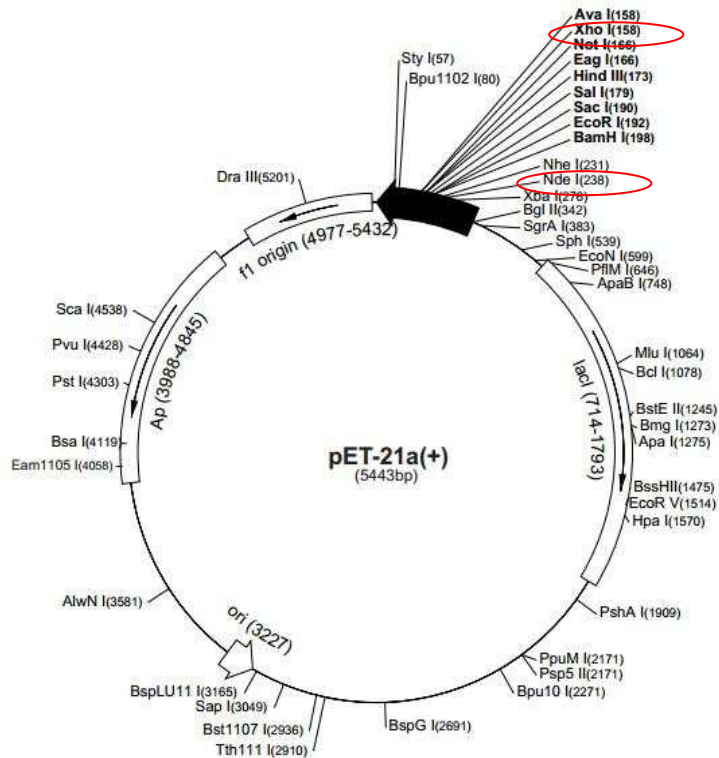
- bakteriální kmeny *E. coli* DH5 α a *E. coli* BL-21(DE3)

Plasmid pET-21c(+)

Pro expresi proteinu *AfGcHK* byl použit expresní vektor pET-21c(+). Na obrázku 12 (strana 36) je zobrazena mapa plasmidu pET-21a(+). Tento plasmid se liší od použitého pET-21c(+) v počtu párů bazí [44]. Expresní vektor pET-21c(+) obsahuje 5441 párů bazí (o 2 páry bazí méně než pET-21a(+)). Dále obsahuje gen, zajišťující rezistenci k ampicilinu, který umožňuje selekci buněk tímto plasmidem transformovaných. Tento plasmid obsahuje T7 promotor, který je specifický pouze pro T7 RNA polymerasu [45]. T7 RNA polymerasa je mnohem výkonnější než RNA polymerasa bakterii *E. coli* vlastní. Gen (v případě pokusů prováděných v rámci této bakalářské práce gen pro *AfGcHK*), který je umístěn za T7 promotorem je exprimován velmi efektivně. Gen pro T7 polymerasu je do bakterie *E. coli* integrován pomocí genomu bakteriofága T7 [45]. K expresi proteinu *AfGcHK* byly využity buňky *E. coli* BL-21(DE3), které tento gen obsahují. Protože gen kódující protein *AfGcHK* je umístěn v blízkosti T7 promotoru a je tak exprimován ve velkém množství. T7 promotor je umístěn v pozici 311-327 bp [44]. Na obrázku 12 (strana 36) je T7 promotor vyznačen jako počátek černé šipky.

Sekvence genu kódující protein *AfGcHK* (obrázek 13, strana 36) byla do plasmidu pET-21c(+) vložena pomocí restrikčních míst *Xho I* a *Nde I* (na obrázku 13 jsou tato

restrikční místa označena červeně). Plasmid pET-21c(+)/AfgCHK byl laskavě poskytnut spolupracující laboratoří profesora Toru Shimizu, Tohoku Universita, Sendai, Japonsko.



Obrázek 12: Restrikční mapa plasmidu pET-21a(+); převzato z [44]

Schéma plasmidu s vyznačením pozic specifických štěpících míst restrikčním endonukleas (pozice XhoI a NdeI jsou označeny červeně), počátku replikace (ori) a genu pro rezistenci k ampicilinu

CATATGACCGGTGTTCCAGAACTGTGTTCTCGAAGAGCTGAAACGCTATGTTGGTTGGGGTGATGGTGATGA
ACGTGCACTGCGTAGTCTGCATGGAGCAGCAGCACCTCATTTTCCACGCCTGGCCGAGGAATTTATGATC
GTATCCTGGGGCATGAAGGGGCTCGTACAGCGCTGGTAGGGGGCGAATCTCAAGTTGGACATCTGAAAGT
CAGCATGATTGCTTGGCTGGATGAATGCTGGGTGCTTGGGACGAAGCTTATTGGGATCGTCGTTATC
GTATTGGTCGTGTTACGCTCCGTATCGGACTGCCTCAGCACTATATGTTTGGCGCTGAATGTTCCACCGTA
CAGGTCTGGCTCGTCTGGCTTATGAACGCTTCCACGGAGATCCTCCGGAAGTGGAGCGTGCCGTAATGCT
CTGGGTAAAGTCTGGACCTGGAGCTGGCTGTTATGCTGCACACCTATCGTGAAGATCTGCTGGCACAGCA
AGCACGTGTAGAACGTCTGTCCACGTTTGGTCAGCTGGTCCGTTCTATTGGACATGATCTGCGCAATCCTCT
GGGGGTTATTGAAACCTCTCTGTATATCCTGCGTACCCGTAAGTGAACGTGCCCCGTAACATC
TGGACCGTATTGGAGAGCAACTGGGTGTTGCCAATGGCATTATCACGAACCTGCTGGACATGATCCGTGAT
CGTCTCTGGCTCGTGAGCCTGTTGAAGTGGCAGCCGTTGTTGGTGGAGCGCGGAAAGTGTCCGCCGTC
TACTGGTGTAGTCTGGCACTGGAGGGACTGGACGCCCTGCCGCTGTCGAAGGTGATCCTGGTCAACTGC
GTCAGGTGTTTGTGAATCTGCTGGAGAATGCCGTTTTTGGCGTAGTCTGAAGGTGTTGTTGCCGTCCGTG
CCTCTCGTGTGATGGACTGGTGGCTCTGGATGTTGAAGATTCTGGTCCGGGCGTTGATCCGGCTACTCGTC
GTCGCCTGTTTGGCCTCTGATTACCACGAAAGACAAAGGCATCGGGCTGGGACTGGCTCTGGTTAAACGT
ATTGCCGAACCCATGGTGGAACTGTCGAGTATAGCGATCGCCCTGGAGGGGGTGCTCGTTTTACTGTCCG
TCTGCCGGCCCTCGAGACACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCCGAAAGAAGCCA
AAGTCC

Obrázek 13: Nukleotidová sekvence genu kódujícího protein AfgCHK, převzato z [39]

Červeně jsou označeny úseky, obsahující specifická restrikční místa, použitá pro manipulaci s genem.

Příprava TB media

Navážka 48 g Bacto Tryptone a 96 g Bacto Yeast extract byla rozpuštěna ve 3,6 l destilované vody. Tento výsledný objem byl rozdělen do 8 Erlenmayerových lahví, po 450 ml roztoku. Lahve byly uzavřeny alobalovou zátkou a sterilizovány. Navážky 9,2 g KH_2PO_4 a 50 g K_2HPO_4 byly rozpuštěny v 300 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo za stálého míchání přidáno 32 ml 50% glycerolu. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na výsledný objem 400 ml a sterilizován. Těsně před použitím bylo ke každému 450 ml sterilnímu Bacto Tryptone a Bacto Yeast Extract přidáno 50 ml sterilního roztoku fosfátů a glycerolu.

Příprava LB media

Navážka 2,5 g Luria Broth byla rozpuštěna ve 100 ml destilované vody. Toto množství bylo převedeno do zásobní lahve a sterilizováno.

Příprava LB agaru

Navážka 4 g Luria Agar byla rozpuštěna ve 100 ml destilované vody. Toto množství bylo převedeno do zásobní lahve a sterilizováno.

Sterilizace medií

Všechna připravená media byla sterilizována horkou parou při teplotě 121 °C (Varioklav 400E, H+P Labortechnik) po dobu 20 minut.

Příprava dialyzačních střev

Konzervační látky a glycerol byly z dialyzačních střev (Spectra Pork 44110 Visking Dialysis Tubing, Type 20/32) odstraněny varem (5 minut, elektrický ohříváč ETA) v 800 ml roztoku obsahujícím 40 g Na_2CO_3 a 14,9 g chelatonu 3. Poté byla dialyzační střeva vařena dalších 5 minut v 800 ml destilované vody. Následně byla dialyzační střeva důkladně omyta destilovanou vodou a byla uchována v 80% (w/v) roztoku ethanolu pro další využití.

3.3 Použité metody

3.3.1 Transformace buněk *E. coli* BL-21 (DE3) a *E. coli* DH5α

Transformace buněk pomocí teplotního šoku je jednoduchá a hojně používaná metoda pro vnášení plasmidové DNA do kompetentní buňky [46]. DNA je po smísení s kompetentními buňkami inkubována na ledu. Tím dochází k připojení DNA k povrchu buněk. Poté je suspenze buněk a DNA vystavena teplotnímu šoku. Tímto šokem je usnadněn vstup DNA do buňky.

Buňky *E. coli* BL-21(DE3) jsou kompetentní buňky, které byly použity pro expresi genu kódujícího protein AfGcHK. Buňky *E. coli* DH5α jsou kompetentní buňky, které byly použity pro produkci (namnožení) vektoru pET-21c(+)/AfGcHK.

Nejprve byly připraveny agarové plotny obsahující ampicilin, aby mohly být selektovány transformované buňky od netransformovaných. Sterilní 1,5% LB agar (viz kapitola 3.2) byl rozpuštěn zahříváním v mikrovlnné troubě. Následující práce byla provedena v laminárním boxu (BIO 126, Labo). Po zchladnutí bylo přeneseno 40 ml agaru do sterilní zkumavky Falcon (50 ml). Do zkumavky naplněné agarem bylo přidáno 40 µl ampicilinu (100 mg ml⁻¹). Směs byla promíchána a obsah zkumavky byl aplikován do dvou sterilních Petriho misek. Misky byly ponechány v laminárním boxu (BIO 126, Labo) na vodorovném povrchu při laboratorní teplotě až do ztuhnutí agaru.

Buňky *E. coli* byly ponechány na ledu rozmraznout. Následující práce byla provedena v laminárním boxu (BIO 126, Labo). Byly připraveny dvě sterilní mikrozkušavky Eppendorf. Do každé z nich bylo napipetováno 30 µl příslušných buněk *E. coli*. Do jedné z nich byl přidán 1 µl vektoru pET-21c(+). Do druhé zkumavky, které byla označena jako kontrolní, vektor přidán nebyl.

Obě mikrozkušavky byly ponechány 60 minut na ledu. Poté byly buňky podrobeny teplotnímu šoku po dobu 45 sekund (v případě *E. coli* BL-21 (DE3)) nebo 90 sekund (v případě *E. coli* DH5α) ve vodní lázni (Julabo TW2, Biotech), vyhřáté na 42 °C. Po vyjmutí z vodní lázně byly buňky přeneseny na led. Po uplynutí tří minut byly buňky přeneseny z ledu do laminárního boxu (BIO 126, Labo). Zde bylo k transformovaným i kontrolním buňkám přidáno 300 µl sterilního LB média a obsah mikrozkušavek byl promíchán. Následovala inkubace 45 minut při teplotě 37 °C (IR 1500 Automatic CO₂ Incubator, Flow Laboratories).

Po inkubaci byly suspenze napipetovány na agarové plotny s ampicilinem (100 mg ml^{-1}) a rovnoměrně rozetřeny po celé ploše (tato práce byla provedena v laminárním boxu). Po vsáknutí suspenze do agaru byly plotny otočeny dnem vzhůru, uzavřeny parafilmem a byly inkubovány při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (IR 1500 Automatic CO_2 Incubator, Flow Laboratories) po dobu 16 hodin. Poté byly plotny s buňkami zkontrolovány a vloženy do lednice, připravené k dalšímu použití (maximálně však 14 dní po transformaci).

3.3.2 Exprese proteinu AfGcHK

3.3.2.1 Kultivace buněk *E. coli* BL-21(DE3)

Příprava medií, užitých ke kultivaci buněk *E. coli* BL-21(DE3) je popsána v kapitole 3.2. Zastoupení živin v LB mediu je vhodné pro rychlý nárůst bakteriálních kolonií, TB medium je využíváno pro expresi proteinů bakteriálními buňkami. Jednobuněčná kolonie tzv. „single cell colony“ z transformovaných buněk *E. coli* BL-21(DE3) (viz kapitola 3.3.1) byla přeočkována v laminárním boxu (BIO 126, Labox) z agarové plotny do zkumavky Falcon obsahující 5 ml LB media a $5 \text{ } \mu\text{l}$ ampicilinu (100 mg ml^{-1}). Přeočkování bylo provedeno sterilním párátkem. Zkumavka s přeočkovánými buňkami byla inkubována v orbitálním shakeru (ORBI-SAFE TS Net Wise, Gallenkamp) při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a 220 RPM po dobu 17 hodin.

Do 8 Erlenmayerových lahví (2 l) obsahujících 0,5 l sterilního TB media (viz kapitola 3.2) bylo napipetováno 0,5 ml ampicilinu (100 mg ml^{-1}). Inokulace byla provedena 0,5 ml suspenze obsahující transformované buňky *E. coli* BL-21(DE3) (viz předchozí odstavec). Proběhla inkubace v orbitálním shakeru (ORBI-SAFE TS Net Wise, Gallenkamp) při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a 180 RPM do doby, než optická denzita OD_{600} buněk *E. coli* v mediu dosáhla hodnoty alespoň 0,6 a naopak nepřekročila hodnotu 1,2 (optická denzita byla měřena na spektrofotometru Spekol 11, CARLZEISS, Jena). Když bylo dosaženo této hodnoty optické denzity, byla kultivace ukončena. Aby bylo možné kontrolovat expresi proteinu AfGcHK před a po indukci IPTG, byl odebrán vzorek buněk *E. coli* před indukcí. Tato kontrola exprese byla provedena pomocí SDS elektroforesy (viz kapitola 3.3.6)

3.3.2.2 Indukce exprese genu kódující protein *AfGcHK*

Použitý vektor pET-21c(+)/*AfGcHK* obsahuje T7 promotor. K expresi genu je proto nutná T7 RNA polymerasa. Z tohoto důvodu byly použity k expresi genu buňky *E. coli* BL-21(DE3), které do svého genomu mají navíc vložen gen pro T7 RNA polymerasu (pomocí bakteriofága DE3) [45]. Tento gen je pod kontrolou *lac* operonu, který je v nepřítomnosti induktoru (laktosa nebo IPTG) blokován represorem (produkt genu *lacI* viz obrázek 12, strana 36) [47]. Po přidavku IPTG je tedy aktivován *lac* operon, který zajistí expresi T7 RNA polymerasy. T7 RNA polymerasa nasedne na T7 RNA promotor, který řídí expresi vneseného genu pro cílový protein. Je tedy splněna hlavní podmínka exprese a to žádná produkce rekombinantního proteinu do okamžiku indukce a maximální produkce proteinu po indukci.

Indukce byla provedena 0,1 mM IPTG po 30 minutách inkubace bakteriální kultury (viz kapitola 3.3.1.) při laboratorní teplotě. Následovala inkubace v orbitálním shakeru (ORBI-SAFE TS Net Wise, Gallenkamp) při 15 °C a 180 RPM po dobu 17 hodin. Exprese genu kódující protein *AfGcHK* byla ukončena centrifugací (Janetzki K 70 D, MLW) při 4 °C a 3000 RPM po dobu 45 minut. Po ukončení exprese byl odebrán kontrolní vzorek buněk *E. coli* po indukci IPTG. Tento vzorek byl analyzován pomocí SDS elektroforesy (viz kapitola 3.3.6). Sklizené buňky byly zváženy a uchovány při - 80 °C pro další využití.

Suspenze (1,5 ml) vzorků buněk (před indukci a po indukci IPTG) pro analýzu pomocí SDS elektroforesy (viz kapitola 3.3.6) byla centrifugována (5 minut, 4°C, 13200 RPM, 5415 R, Eppendorf). K peletě bylo vždy přidáno 30 µl destilované vody a 10 µl 4x koncentrovaného redukujícího pufru (složení viz kapitola 3.3.6).

3.3.3 Izolace plasmidové DNA

Izolace vektoru pET-21c(+) nesoucí gen kódující protein *AfGcHK* byla rozdělena do několika částí. Nejprve bylo třeba transformované buňky *E. coli* DH5a přeočkovat z agarové plotny do zkumavky Falcon, kde došlo k jejich namnožení a nárůstu. Poté bylo třeba rozrušit buněčné stěny, aby byla plasmidová DNA uvolněna z buněk [48]. Dalším krokem byla fenol/chloroformová extrakce. Při této extrakci přechází proteiny do organické fáze, zatímco DNA přechází do vodné fáze. Dalším krokem byla precipitace

DNA. Poté byla odstraněna RNA, byly inaktivovány DNasy a byly odstraněny případné proteiny.

Jednobuněčná kolonie (tzv., „single cell colony“) z transformovaných buněk *E. coli* DH5 α (viz kapitola 3.3.1) vektorem pET-21c(+)/*AfGcHK* byla přenesena do zkumavky obsahující 10 ml LB media a 10 μ l ampicilinu (100 mg ml⁻¹). Zkumavka byla inkubována v orbitálním shakeru (ORBI-SAFE TS Net Wise, Gallenkamp) při 37 °C a 220 RPM po dobu 17 hodin. Kultivace buněk byla ukončena centrifugací (Allegro X-22R, Beckman Coulter) při 4 °C, 4500 RPM po dobu 30 minut.

Buňky byly poté umístěny na led. Do zkumavky bylo přidáno 200 μ l vychlazeného roztoku obsahujícího 50 mM roztok glukosy, 25 mM roztok Tris-HCl, pH 8.0 a 10 mM roztok EDTA. Buňky byly intenzivně resuspendovány pomocí pipety. Suspenze buněk byla přenesena do mikrozskumavky Eppendorf (1,5 ml). Poté byly buňky inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Do mikrozskumavky bylo dále přidáno 300 μ l lyzujícího roztoku (0,2 M NaOH, 1% roztok SDS) a obsah mikrozskumavky byl opatrně promíchán. Poté byl obsah mikrozskumavky inkubován 5 minut při laboratorní teplotě. Následně bylo do mikrozskumavky napipetováno 200 μ l vychlazeného 3 M roztoku acetátu draselného, pH 4,8. Obsah zkumavky byl opatrně promíchán a poté byl inkubován na ledě po dobu 10 minut. Následovala centrifugace při 4 °C a 13200 RPM (5415 R, Eppendorf) po dobu 10 minut.

Supernatant byl opatrně odebrán tak, aby nedošlo k jeho kontaminaci precipitátem a byl přenesen do čisté mikrozskumavky (1,5 ml). K tomuto supernatantu bylo přidáno 700 μ l činidla fenol/chloroform/isoamylalkohol (25:24:1) a obsah mikrozskumavky byl po dobu tří minut intenzivně třepán. Centrifugací při 4 °C, 13200 RPM po dobu 10 minut (5415 R, Eppendorf) byla poskytnuta vodná fáze oddělená od fáze fenolu. Vodná fáze byla přenesena do čisté mikrozskumavky (1,5 ml) a bylo k ní přidáno 700 μ l isopropanolu. Obsah mikrozskumavky byl promíchán a inkubován 10 minut na ledě. Poté byla mikrozskumavka opět centrifugována při 4 °C, 13200 RPM (5415 R, Eppendorf) po dobu 10 minut. Supernatant byl odstraněn a peleta byla promyta 75% ethanolem vychlazeným na -20 °C. Peleta byla vysušena pomocí vakuové odparky (Speed Vac, DNA 110, Savant). Poté byla peleta rozpuštěna ve 100 μ l TE pufru (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) s obsahem 2 μ l RNasy A (1 mg ml⁻¹). Tento roztok byl inkubován 20 minut při teplotě 37 °C. Poté byl obsah převeden do nové mikrozskumavky (0,5 ml) a bylo přidáno 60 μ l PEG roztoku (20% PEG, 2,5 M NaCl) a obsah mikrozskumavky byl inkubován 2 hodiny na ledu.

Následovala centrifugace při 4 °C a 13200 RPM (5415 R, Eppendorf) po dobu 15 minut. Byl odstraněn supernatant a peleta byla promyta 170 µl 70% vychlazeného ethanolu a vysušena pomocí vakuové odparky (Speed Vac, DNA 110, Savant). Po vysušení byla peleta rozpuštěna ve 20 µl sterilního TE pufru (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0).

Získaný plasmid byl charakterizován. Byla stanovena jeho koncentrace měřením absorbance při 260 nm a 280 nm (NanoVue™ Plus Spectrophotometer, GE Healthcare Bio-Sciences AB). Následně byl plasmid uložen při - 20 °C, kde byl uchován pro další využití.

3.3.4 Restrikční analýza plasmidu pET-21c(+) endonukleasami *Xho I* a *Nde I*

Aby bylo potvrzeno, že plasmidem, který byl izolován je skutečně pET-21c(+)/*AfGCHK* byla provedena restrikční analýza. Tento plasmid byl štěpen endonukleasami *Xho I* a *Nde I* na dva různě dlouhé celky (viz mapa plasmidu na obrázku 12, strana 36 a sekvence s vyznačenými restrikčními místy na obrázku 13, strana 36).

Ke štěpení bylo použito: 1 µl plasmidové DNA, 0,5 µl *Xho I*, 0,5 µl *Nde I*, 1µl pufru NEB 4 (10 x koncentrovaný) a sterilní voda do celkového objemu 10 µl. Složení pufru NEB 4 [49]: 50 mM acetát draselný, 20 mM Tris-acetát, 10 mM acetát hořečnatý, 1 mM dithiotreitol.

Jednotlivé složky byly pipetovány do sterilní mikrozkušavky Eppendorf a vzniklá směs byla inkubována při 37 °C po dobu 90 minut (IR 1500 Automatic CO2 Incubator, Flow Laboratories). Poté byly ke směsi přidány 2 µl vzorkového pufru (roztok 40% sacharosy s 91% bromfenolovou modří) a byla provedena agarosová elektroforesa (viz kapitola 3.3.7)

3.3.5 Izolace proteinu *AfGCHK* z buněk *E. coli* BL-21(DE3)

Během izolace proteinu *AfGCHK* z buněk *E. coli* BL-21(DE3) byly použity následující roztoky:

- **Pufr A:** 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl
- **Pufr A₁:** 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,2 mg/ml lysozym
- **Pufr A₂:** 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 10 mM imidazol

- **Pufr A₃**: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 20 mM imidazol
- **Pufr A₄**: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 200 mM imidazol

Zmražené suspendované buňky (17 g) obsahující protein *A/GcHK* byly šetrně rozmrazeny na ledu. Poté byly buňky resuspendovány ve 100 ml pufru A₁. Dále byly za stálého míchání a chlazení na ledu narušeny buněčné membrány za použití ultrazvukové sonikace (Sonopuls HD 3100, sonda KE 76, Bandelin). Ultrazvuková sonikace byla provedena třikrát po dobu 2 minut při amplitudě 55%. Mezi jednotlivými sonikacemi byla vždy 2 minutová pauza. Následovala centrifugace 45 minut při 4 °C a 15 300 RPM (Allegro X-22R, Beckman Coulter). Byl odebrán kontrolní vzorek pelety frakce (viz tabulka 2 v této kapitole, sloupec 3, strana 45), který byl analyzován pomocí SDS elektroforesy (viz kapitola 3.3.6)

Supernatant byl spojen a podroben opětovné centrifugaci 20 minut při 4 °C a 15 300 RPM (Allegro X-22R, Beckman Coulter). Byl odebrán kontrolní vzorek supernatantu z obou provedených centrifugací (viz tabulka 2 v této kapitole, sloupec 1 a 2, strana 45), který byl analyzován pomocí SDS elektroforesy (viz kapitola 3.3.6). Nakonec byl supernatant převeden do čisté kádinky (100 ml) a byl k němu přidán hemin rozpuštěný v dimethylsulfoxidu ve výsledné koncentraci 50 μM. Tato směs byla inkubována při 4 °C za stálého míchání 20 minut.

Následoval krok afinitní chromatografie. Afinitní chromatografie je využívána k selekci proteinů na základě vazby imidazolových zbytků několika za sebou jdoucích histidinů (tzv. histidinové kotvy), umístěných na C- nebo N- konci vybraného proteinu, k přechodnému kovu vázanému na chemicky inertní podklad (afinitní gel) [50]. Eluce proteinu navázaného histidinovou kotvou k přechodnému kovu je dosažena přidáním imidazolu do elučního pufru. Imidazol je na kolonu aplikován v různých koncentracích. Nižšími koncentracemi imidazolu dochází k odstranění proteinů, které nejsou k přechodnému kovu vázány příliš silně (interferenční proteiny). Tímto krokem jsou tedy odstraněny nežádoucí proteiny, které tvoří s přechodným kovem vazbu prostřednictvím histidinových skupin. Protein s histidinovou kotvou je následně z afinitního gelu vymyt roztokem imidazolu o vyšší koncentraci [10]. Izolovaný protein *A/GcHK* má histidinovou kotvu umístěnou na C- konci.

Tři mililitry afinitního gelu (TALON® Metal Affinity Resin) byly převedeny (ekvilibrovány) do pufru A (4x 10 ml pufru A) centrifugací při 4°C a 750 RPM (Allegro X-22R, Beckman Coulter). Ekvilibrovaný gel byl přidán ke směsi supernatantu a heminu. Tato směs byla inkubována po dobu 60 minut za stálého míchání při 4 °C (Mini Rocker MR-1, BioSan). Poté byla tato směs převedena na prázdnou chromatografickou kolonu s fritou. Afinitní gel byl promyt třikrát 15 ml pufru A. Dále byly zachyceny frakce eluované 10 ml pufru A₂ (obsahující 10 mM imidazol), 15 ml pufru A₃ (obsahující 20 mM imidazol) a 15 ml pufru A₄ (obsahující 200 mM imidazol). Během afinitní chromatografie byly odebírány kontrolní vzorky, které byly analyzovány pomocí SDS elektroforesy (viz kapitola 3.3.6). Konkrétně se jedná o následující vzorky: vzorek cytosolární frakce, která nebyla navázána na afinitní gel (viz tabulka 2 v této kapitole, sloupec 4, strana 45), vzorek frakce eluované z kolony 10 mM roztokem imidazolu (viz tabulka 2 v této kapitole, sloupec 5, strana 45), vzorek frakce eluované z kolony 20 mM roztokem imidazolu (viz tabulka 2 v této kapitole, sloupec 6, strana 45) a vzorek frakce eluované z kolony 200 mM roztokem imidazolu (viz tabulka 2 v této kapitole, sloupec 7, strana 45).

Protože tyto pufrы obsahovaly různé koncentrace imidazolu, byl imidazol odstraněn ze všech tří frakcí dialýzou (dialyzační střeва - Spectra Pore 44110 Visking Dialysis Tubing, Type 20/32) proti 3 x 5 l 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 a za stálého míchání přes noc (magnetická míchačka KMO2 basic, IKA) při teplotě 4 °C. Po ukončení dialýzy byla dialyzační střeва důkladně omyta destilovanou vodou a jejich obsah byl centrifugován při 4 °C a 4 500 RPM (Allegro X-22R, Beckman Coulter) po dobu 20 minut. Pro analýzu pomocí SDS elektroforesy (viz kapitola 3.3.6) byly odebrány následující vzorky: precipitát z eluátu 200 mM imidazolem (viz tabulka 2 v této kapitole, sloupec 8, strana 45), a dále vzorky supernatantů všech eluátů, konkrétně eluát 200 mM roztokem imidazolu (viz tabulka 2 v této kapitole, sloupec 9, strana 45), eluát 20 mM roztokem imidazolu (viz tabulka 2 v této kapitole, sloupec 10, strana 45) a eluát 10 mM roztokem imidazolu (viz tabulka 2 v této kapitole, sloupec 11, strana 45).

Supernatanty všech tří frakcí byly odděleny a přeneseny do zkumavky Milipore obsahující membránu vhodnou pro zakoncentrování proteinů s molekulovou hmotností větší než 30 000 Da. Supernatanty byly centrifugovány při 4 °C a 15 400 RPM (Allegro X-22R, Beckman Coulter) do doby, než měly všechny frakce proteinu AfGcHK objem přibližně 300 µl. Z těchto finálních frakcí byly odebrány vzorky (viz tabulka 2 v této kapitole, strana 45, sloupec 12 – frakce eluovaná 200 mM roztokem imidazolu, sloupec

13 – frakce eluovaná 20 mM roztokem imidazolu a sloupec 14 – frakce eluovaná 10 mM roztokem imidazolu), které byly analyzovány pomocí SDS elektroforesy (viz kapitola 3.3.6). Preparáty byly rozděleny do alikvotů po 50 μl , zmrazeny pomocí kapalného dusíku a uchovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Finální preparát AfGcHK byl primárně charakterizován spektrofotometrickým měřením (Diod Array 8453, Hewlett-Packard). Vzorek byl 100x naředěn 20 mM TRIS, pH 8,0 a bylo měřeno spektrum v rozsahu 250 – 700 nm. Další spektrum bylo zaznamenáno po redukci dithioničitanem sodným. Poslední spektrum obsahovalo redukovaný protein vystavený po dobu 5 minut oxidu uhelnatému.

V průběhu izolace proteinu AfGcHK byly průběžně odebírány vzorky jednotlivých kroků. Tyto vzorky byly analyzovány pomocí SDS elektroforesy (viz kapitola 3.3.6). Množství odebraných vzorků a k nim přidané množství destilované vody a 4x koncentrovaného redukující pufru (složení viz kapitola 3.3.6) je znázorněno v tabulce 2.

Tabulka 2: Složení jednotlivých vzorků, odebíraných v průběhu izolace proteinu AfGcHK

Tyto vzorky byly analyzovány pomocí SDS elektroforesy (viz kapitola 3.3.6)

číslo vzorku	1	2	3	4	5	6	7
konkrétní frakce izolačního postupu [μl^{-1}]	*	*	5	10	30	30	5
destilovaná voda [μl^{-1}]	30	30	10	20	-	-	10
4 x koncentrovaný redukující pufr [μl^{-1}]	10	10	5	10	10	10	5

číslo vzorku	8	9	10	11	12	13	14
konkrétní frakce izolačního postupu [μl^{-1}]	5	5	5	5	1	1	1
destilovaná voda [μl^{-1}]	10	10	10	10	14	14	14
4 x koncentrovaný redukující pufr [μl^{-1}]	5	5	5	2	5	5	5

* V případě pevných vzorků byla odebrána část vzorku pomocí špachtle

3.3.6 Diskontinuální elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)

Diskontinuální elektroforesa SDS-PAGE je často používanou metodou pro analytické dělení proteinů podle jejich molekulové hmotnosti [10]. SDS je detergent, který se pevně váže k proteinům a mění jejich tvar do válcovité podoby. Navázaný SDS (aniontový detergent) uděluje všem proteinům silný negativní náboj. Následkem toho se proteiny obsahující SDS dělí působením elektrického pole na gelu podle své molekulové hmotnosti.

Při diskontinuální elektoroforese jsou využívány dva typy separačních gelů - zaostřovací a separační gel. Tyto gely se liší velikostí svých pórů. Oba gely vznikají kopolymerací akrylamidu a N,N-methylen-bis-akrylamidu [10]. Polymerace je zahájena volnými radikály. Ty vznikají při rozkladu persíranu amonného působením světla za přítomnosti malého množství kyslíku. Kromě persíranu amonného je do polymerační směsi přidán také TEMED. TEMED stabilizuje vzniklé volné radikály. Velikost pórů gelu je dána podílem polyakrylamidu v gelu.

Vizualizace vzniklých pruhů na elektroforetickém gelu je prováděna nejrůznějšími technikami. Proteiny se obvykle barví. A to ponořením gelu do kyselého roztoku obsahujícího alkohol a barvivo „Coomassie Brilliant Blue“ [10]. Tím dochází k vytvoření komplexu barvivo – protein. Přebytek barviva je odstraněn pomocí omývání gelu kyselým roztokem.

Použité roztoky:

- **Pufř A:** 0,375 M Tris-HCl; 0,1% SDS (w/v); pH 8,8
- **Pufř B:** 0,125 M Tris-HCl; 0,1% SDS (w/v); pH 6,8; 0,0006% bromfenolová modř
- **Polymerační roztok A:** 30% akrylamid (w/v); 0,8% BIS (w/v) v pufřu A
- **Polymerační roztok B:** 30% akrylamid (w/v); 0,8% BIS (w/v) v pufřu A
- **Elektrodový pufř:** 0,025 M Tris-HCl; 0,192 M glycin; 0,1% SDS (w/v); pH 8,3
- **Vzorkový redukující pufř (4x koncentrovaný):** 0,25 M Tris-HCl; 8% SDS (w/v); 40% glycerol (v/v); 20% 2-merkptoethanol (v/v); 0,012% bromfenolová modř (w/v); pH 6,8
- **Barvicí lázeň:** 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v); 46% ethanol (v/v); 9,2% kyselina octová (v/v)
- **Odbarvovací lázeň:** 25% ethanol (v/v); 10% kyselina octová (v/v)

Byla připravena aparatura na SDS elektroforesu (miniVE Vertical) se dvěma skly a mezi nimi umístěnými „spacery“. Separací gel (12% w/v) byl připraven smícháním 4,5 ml pufřu A, 3,0 ml polymeračního roztoku A, 7,5 μ l TEMEDu a 75 μ l roztoku persíranu amonného (100 mg ml⁻¹). Tato směs byla promíchána a pomocí automatické pipety byla přenesena mezi dvě skla oddělená „spacery“, která byla umístěna vertikálně v elektroforetické aparatuře. Na tuto nanesenou směs byla nalita vrstva vody. Po 30 minutách, kdy gel dostatečně ztuhl, byla vrstva vody odstraněna.

Zaostřovací gel (4% w/v) byl připraven smícháním 2,6 ml pufru B, 400,0 μ l polymeračního roztoku B, 3,0 μ l TEMEDu a 60,0 μ l persíranu amonného (100 mg ml⁻¹). Směs byla promíchána a umístěna na vrstvu zatuhlého separačního gelu. Do zaostřovacího gelu byl vložen deseti nebo patnácti jamkový hřeben. Poté, co gel dostatečně ztuhl, byl hřeben vyjmut. Byl otevřen spodní těsnicí díl elektroforetické aparatury a aparatura byla umístěna do elektroforetické vany. Elektrodový prostor elektroforetické aparatury byl naplněn elektrodovým pufrem. Vhodně zředěné vzorky byly smíchány s odpovídajícím množstvím 4 x koncentrovaného vzorkového redukovacího pufru (viz kapitola 3.3.2 a 3.3.5 tabulka 2). Výsledný roztok byl krátce povařen (přibližně 5 minut). Vzorky byly stočeny na stolní minicentrifuze (stolní minicentrifuga Gilson, GmC Lab). Do jamek zaostřovacího gelu byly pomocí Hamiltonovy stříkačky nanášeny vzorky a marker. Elektroforesa probíhala přibližně 2 hodiny za použití přístroje EPS 301. Při průchodu zaostřovacím gelem probíhala elektroforesa při napětí 80 V (přibližně 25 minut). Při průchodu separačním gelem bylo napětí nastaveno na 110 V (přibližně 90 minut).

Po ukončení elektroforesy byl odebrán separační gel, který byl vložen do Petriho misky s barvicí lázní. Miska byla 60 minut intenzivně třepána. Poté byl umístěn do Petriho misky s odbarvovací lázní, kde byl za stálého třepání ponechán 40 minut. Lázeň byla vyměněna a gel byl odbarvován dalších 17 hodin. Za tuto dobu byl gel dostatečně odbarven.

3.3.7 Horizontální agarosová elektroforesa

Pro dělení látek s velkou molekulovou hmotností (200 kDa) je nutné použít gely s velkými póry [10]. K tomuto účelu jsou využívány 1% agarosové gely. Molekuly DNA mají díky svým fosfátovým skupinám záporný náboj. Velikost záporného náboje je dána v podstatě délkou lineárního řetězce molekuly DNA. Při horizontální agarosové elektroforese se tak molekuly lineární DNA dělí podle své velikosti.

Byl připraven roztok 1% (w/v) agarosy ve 40 ml TAE pufru (0,04 M Tris-acetát; pH 8,2; 1 mM EDTA). Agarosa byla rozpuštěna ohřevem v mikrovlnné troubě za občasného promíchání. Po ochlazení agarosy byly do roztoku přidány 4 μ l barviva SYBR SAFETM DNA gel Stain (10000x koncentrované). Roztok byl poté promíchán a nalit do elektroforetické vaničky a do gelu byl upevněn hřeben pro vytvoření jamek pro nanášení vzorků. Po ztuhnutí gelu byl gel vyjmut a vanička s gelem byla umístěna do

elektroforetické aparatury (MSMINI 10-Multi Sub Mini, Uvitec), která byla naplněna TAE pufrem. Do jamek byly nanášeny vzorky obsahující vzorkový pufr (roztok 40% sacharosu s 91% bromfenolovou modří) (viz kapitola 3.3.4) a Lambda DNA/EcoRI and Hind III marker. Elektroforesa probíhala přibližně 35 minut za použití zdroje EPS 301 při napětí 110 V. Po ukončení elektroforesy byl gel umístěn na transiluminátor (Dark Reader, Clare Chemical Research), kde byla DNA vizualizována a obraz byl zaznamenán.

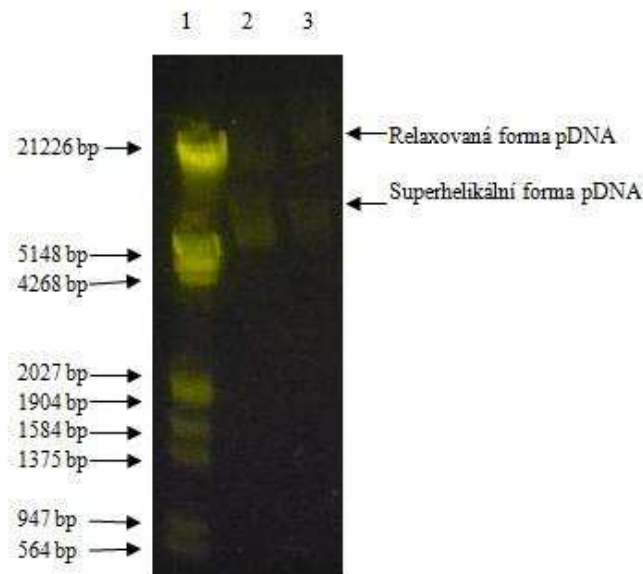
4 Výsledky

4.1 Izolace plasmidové DNA

Aby bylo možné produkovat plyn-detekující protein *AfGcHK*, bylo nutné namnožit a následně izolovat plasmid pET-21c(+) nesoucí gen kódující protein *AfGcHK*. Transformace buněk *E. coli* DH5 α vektorem pET-21c(+)/*AfGcHK* byla úspěšná. Na selekčním mediu bylo vidět velké množství vzniklých kolonií. Vybrané kolonie byly přeočkovány metodou jednobuněčné kolonie (tzv. „single cell colony“) a namnoženy ve větším objemu selekčního media. Ze získané kultury byla izolována amplifikovaná plasmidová DNA (pDNA) metodou fenol/chloroformové extrakce (viz kapitola 3.3.3). Byly získány tři paralelní vzorky roztoku plasmidu pET-21c(+)/*AfGcHK*, každý o objemu 20 μ l.

Plasmidová DNA izolovaná z klonů buněk *E. coli* DH5 α byla analyzována pomocí agarosové elektroforesy (viz kapitola 3.3.7). Výsledek této agarosové elektroforesy je zobrazen na obrázku 14, strana 50. Na 1% agarosový gel byly naneseny dva různé 20 x ředěné vzorky plasmidové DNA (dráhy 2 a 3, obrázek 14, strana 50) a Lambda DNA/EcoRI and Hind III marker o velikosti od 564 do 21226 párů bazí (dráha 1, obrázek 14, strana 50). Použité 20 x naředěné vzorky plasmidové DNA byly připraveny pro spektrální analýzu plasmidové DNA, za účelem zjištění koncentrace plasmidové DNA (viz dále v této kapitole). Nebyly čerstvě připraveny pro agarosovou elektroforesu, obrázek této elektroforesy je proto nekvalitní. Vektor pET-21c(+)/*AfGcHK* má velikost (obsahuje) 6592 párů bazí. Elektroforetická mobilita plasmidové (cirkulární) DNA je určena nejen velikostí molekuly DNA, ale také její strukturou. Pokud plasmidová DNA nevykazuje nadšroubovicové vinutí, je v tzv. relaxované formě. V relaxované formě putuje plasmidová DNA agarosovým gelem nejpomaleji. Vykazuje-li plasmidová DNA tzv. nadšroubovicové vinutí (superhelikální forma), je více kompaktní a putuje gelem rychleji. Přibližně stejně rychle jako plasmidová DNA v nadšroubovicovém vinutí putuje i lineární forma plasmidové DNA. Nicméně nelze mobilitu cirkulární DNA srovnávat s mobilitou lineárních fragmentů DNA přítomných v markeru. Izolovaná plasmidová DNA (pET-21c(+)/*AfGcHK*) tvoří na agarosovém gelu dvě majoritní frakce. První frakci lze nalézt na místě odpovídajícímu 6592 párů bazí (dráha 2, 3, obrázek 14, strana 50) a druhou frakci v oblasti 21000 bp (dráhy 2,3, obrázek 14, strana 50). Pomalejší frakce plasmidové

DNA pravděpodobně odpovídá relaxované struktuře pDNA, zatímco rychlejší frakce superhelikální formě DNA. Pokud by ve vzorku plasmidové DNA byla obsažena RNA, její mobilita by byla výrazně rychlejší než mobilita plasmidové DNA. Vyskytovala by se proto v dolní části agarosového gelu. Naproti tomu genomová DNA bakterie *E. coli* by díky většímu počtu párů bazí putovala agarosovým gelem pomaleji než plasmidová DNA. Na agarosovém gelu se v horní ani spodní oblasti gelu žádné fragmenty nevyskytují (dráhy 2,3 obrázek 14). Lze proto předpokládat, že izolace plasmidové DNA byla úspěšná a vektor pET-21c/*AfGcHK* byl izolován v čisté formě.

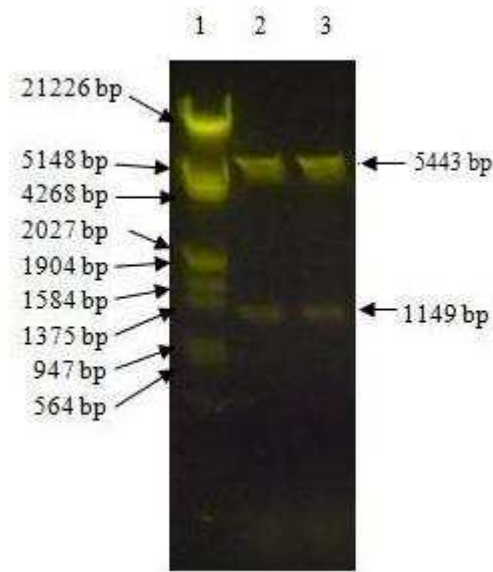


Obrázek 14: Analýza izolované plasmidové DNA (pET-21c(+)/*AfGcHK*) pomocí elektroforesy na 1% agarovém gelu

- 1: Lambda DNA/*EcoRI* and *Hind III* marker
- 2: 20x naředěný vzorek izolované plasmidové DNA
- 3: 20x naředěný vzorek izolované plasmidové DNA

Pro kontrolu, že plasmidová DNA izolovaná z klonů buněk *E. coli* DH5 α je skutečně vektor pET-21c(+)/*AfGcHK*, byla provedena restriční analýza s využitím restričních endonukleas *Xho I* a *Nde I*. Restriční endonukleasy rozpoznávají selektivně krátké sekvence nukleotidů a ve svých specifických místech dvoušroubovici DNA štěpí. V sekvenci nukleotidů použitého plasmidu pET-21c(+)/*AfGcHK*, je pouze jediné restriční místo pro endonukleasu *Xho I* a jediné restriční místo pro *Nde I*. Působením obou restričních endonukleas současně dojde ke štěpení plasmidové DNA právě na dva úseky a to na úsek odpovídající genu kódujícímu protein *AfGcHK* (1149 párů bazí) a na úsek odpovídající zbytku vektoru pET-21c(+) (5443 párů bazí). Výsledek kontrolního štěpení dvou vzorků izolovaného vektoru je na obrázku 15 (strana 51), kde fragmenty štěpení byly

analyzovány pomocí agarosové elektroforezy (viz kapitola 3.3.7). Pro identifikaci jednotlivých fragmentů byl použit Lambda DNA/EcoRI and Hind III marker (564 – 21226 bp) (dráha 1, obrázek 15). Na 1% agarosovém gelu se vyskytují pouze dva pruhy, nacházející se přibližně v oblastech 5500 a 1200 pb (dráhy 2, 3, obrázek 15) podle srovnání s markery (dráha 1, obrázek 15). Tyto dva fragmenty jsou proto důkazem, že izolace plasmidové DNA proběhla úspěšně a izolovaný plasmid je s největší pravděpodobností pET-21c(+)/AfGcHK.



Obrázek 15: Restriční Analýza vektoru pET-21C(+)/AfGcHK štěpeného restričními endonukleasami Xho I a Nde I (elektroforesa fragmentů na 1% agarovém gelu)

- 1: Lambda DNA/EcoRI and Hind III marker
- 2: Vzorek vektoru pET-21c(+)/AfGcHK s přidanými endonukleasami
- 3: Vzorek vektoru pET-21c(+)/AfGcHK s přidanými endonukleasami

U všech tří vzorků izolované plasmidové DNA byla spektrometricky určena koncentrace pDNA a čistota pDNA (výsledky této analýzy jsou zobrazeny v tabulce 3, strana 52). Nukleové kyseliny absorbují při vlnové délce 260 nm. Je-li $A_{260} = 1$ znamená to, že roztok obsahuje plasmidovou DNA o koncentraci $0,05 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$. Průměrná koncentrace pDNA tří měřených vzorků je $1,84 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$. V celkovém objemu $60 \mu\text{l}$ bylo získáno $110,4 \mu\text{g}$ plasmidové DNA ve třech paralelních vzorcích. Čistota izolované plasmidové DNA se stanovuje pomocí poměru hodnot absorbancí při vlnové délce 260 a 280 nm (A_{260}/A_{280}). Pokud je hodnota tohoto poměru v intervalu hodnot $1,6 - 2,0$ lze předpokládat, že se v roztoku nachází čistá plasmidová DNA bez kontaminace proteiny. Hodnoty poměrů A_{260}/A_{280} tří vzorků se v rozsahu tohoto intervalu vyskytují (tabulka 3, strana 52). Izolaci plasmidové DNA pomocí fenol/chloroformové extrakce byl získán čistý

vektor pET-21c(+)/*AfGcHK* vhodný pro další experimenty, zvláště pak pro expresi proteinu *AfGcHK*.

Tabulka 3: Spektrometrické určení čistoty a koncentrace vzorků pDNA

Vzorky byly před měřením ředěny 20x. Výsledná koncentrace vzorku je již přepočítána na neředěný vzorek.

vzorek č.	A ₂₆₀	A ₂₈₀	c _{pDNA} [μg μl ⁻¹]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	V _{vzorek} [μl]	výtěžek [μg]
1	2,63	1,43	2,63	1,8	20	52,6
2	1,82	0,95	1,82	1,9	20	36,4
3	1,07	0,57	1,07	1,9	20	21,4

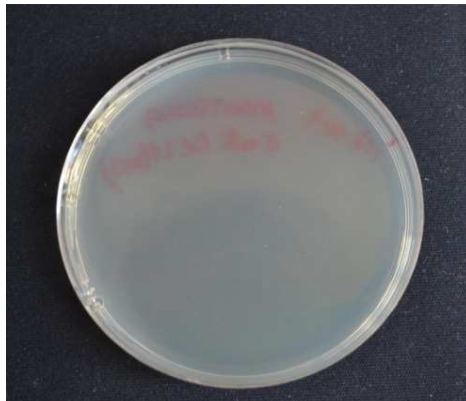
4.2 Exprese proteinu *AfGcHK*

4.2.1 Transformace buněk

Vektor pET-21c(+)/*AfGcHK* byl transformován do buněk *E. coli* kmene BL-21(DE3), který je určen k expresi genů pomocí T7 RNA polymerasy. Použitý plasmid obsahuje gen, díky kterému transformované buňky získaly rezistenci vůči ampicilinu. Této selekce, kterou ampicilinová rezistence poskytuje, bylo využíváno ve většině kroků vedoucích k expresi proteinu *AfGcHK* (viz kapitola 3.3.2). Všechn materiál a media byla před použitím sterilizována a veškerá manipulace s buňkami *E. coli* BL-21(DE3) byla aseptická.

Během selekce transformovaných buněk *E. coli* BL-21(DE3) na agarové plotny obsahující ampicilin o koncentraci 100 μg ml⁻¹ byl proveden kontrolní krok. Na agarovou plotnu s ampicilinem (100 μg ml⁻¹) byly vysety také buňky *E. coli* BL-21(DE3) netransformované vektorem pET-21c(+)/*AfGcHK*. S buňkami, které byly transformovány, i s buňkami, které transformovány nebyly, bylo manipulováno stejným způsobem. Pokud by došlo k nárůstu bakteriálních kolonií na kontrolní agarové plotně, bylo by vysoce pravděpodobné, že experiment je znehodnocen v důsledku kontaminace nebo poškození kompetentních buněk *E. coli* BL-21(DE3), které sami o sobě rezistenci k ampicilinu nemají. Po inkubaci byly tedy obě agarové plotny zkontrolovány. Kontrolní agarová plotna neobsahovala žádné bakteriální kolonie (obrázek 16, strana 53), kontrolní experiment byl tedy úspěšný, nedošlo ani ke kontaminaci, ani ke znehodnocení kompetentních buněk. Na obrázku 17 (strana 53) je zobrazena agarová plotna s ampicilinem (100 μg ml⁻¹) na níž

byly naneseny buňky *E. coli* BL-21(DE3) transformované plasmidem pET-21c(+)/AfGcHK. Na tomto mediu je vidět velké množství (cca 200) bakteriálních kolonií. Transformace buněk *E. coli* BL-21 (DE3) vektorem pET-21c(+)/AfGcHK proběhla tedy úspěšně.



Obrázek 16: Kontrolní agarová plotna

Na kontrolní agarovou plotnu obsahující ampicilin ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) byly vysety buňky *E. coli* BL-21(DE3), které nebyly transformovány plasmidem, udělujícím těmto buňkám rezistenci na ampicilin. Protože na této plotně nenarostly žádné bakteriální kolonie, lze předpokládat, že práce s buňkami byla aseptická a kompetentní buňky *E. coli* BL-21(DE3) nebyly znehodnoceny přítomností jiného plasmidu.



Obrázek 17 : Agarová plotna s koloniemi buněk *E. coli* BL-21(DE3) transformovanými plasmidem pET-21c(+)/AfGcHK

Na agarovou plotnu obsahující ampicilin ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) byly vysety buňky *E. coli* BL-21(DE3), transformované plasmidem pET-21c(+)/AfGcHK, které mají rezistenci na ampicilin. Po inkubaci na tomto mediu vyrostlo velké množství kolonií (cca 200). Transformace buněk *E. coli* BL-21(DE3) vektorem pET-21c(+)/AfGcHK proběhla tedy úspěšně.

4.2.2 Kultivace buněk *E. coli* BL-21(DE3) a exprese proteinu AfGcHK

Dalším krokem exprese proteinu AfGcHK, byla kultivace bakterií. Během kultivace dochází k namnožení bakterií z inokulátu (jednobuněčná kolonie tzv.,,single cell

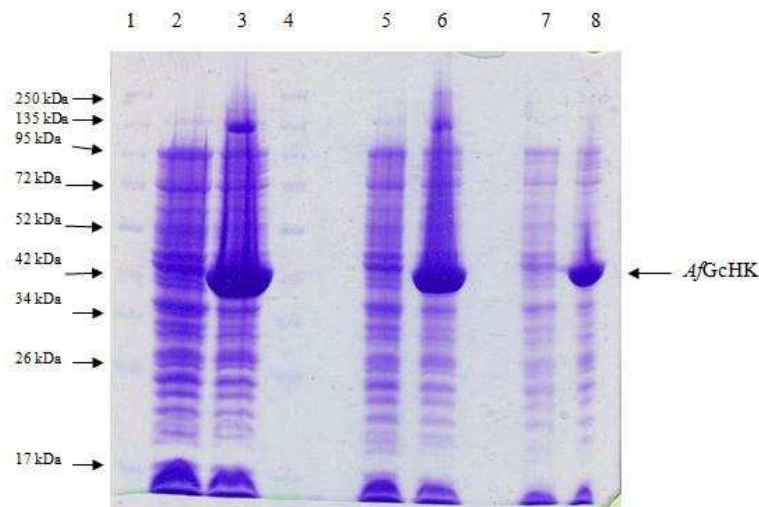
colony“ ve velkém objemu TB media (viz kapitola 3.2) obsahujícího 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ampicilinu). Bakterie byly množeny pro účely exprese proteinu, proto bylo nutné nárůst kolonií hlídat. Pro efektivní expresi tohoto proteinu je stanovené optimální rozmezí optické denzity 0,6 – 1,2 v TB médiu při 600 nm (viz kapitola 3.3.2.1). Během kultivace byla proto optická denzita sledována. Odebraný vzorek média po 5,5 hodinách kultivace vykazoval hodnotu: $\text{OD}_{600} = 1,025$. Jelikož se tato hodnota nachází v rozmezí výše uvedených hodnot pro optickou denzitu, byla provedena indukce (k bakteriálním koloniím byl přidán 0,1 mM IPTG pro zahájení exprese) (viz kapitola 3.3.2.2).

Po sklizení buněk centrifugací, byly samotné buňky zváženy. Ze 4 litrů TB media (8 x 0,5 l) bylo vyprodukováno celkem 35 g buněk *E. coli* BL-21(DE3), které obsahovaly exprimovaný protein AfGcHK.

4.2.3 Kontrolní SDS elektroforesa

Aby bylo potvrzeno, že získané bakteriální buňky (viz kapitola 4.2.2) obsahují exprimovaný protein AfGcHK, byla provedena SDS elektroforesa (viz kapitola 3.3.6). Byl použit 12% separační akrylamidový gel s obsahem SDS. Do jamek elektroforetického gelu byly nanášeny 3 μl markeru SpectraTM Multicolor Broad Range Protein Ladder (dráha 1 a 4 obrázek 18, strana 55) a dále byly do jamek nanášeny vzorky bakteriálních proteinů před indukcí (dráha 2, 5 a 7, obrázek 18, strana 55) a po indukcí (dráhy 3, 6 a 8, obrázek 18, strana 55) exprese AfGcHK pomocí IPTG. Po předchozí zkušenosti s výsledky SDS elektroforesy proteinu AfGcHK byly tytéž dva vzorky nanášeny v různých objemech a to sestupně – 5 μl , 3 μl , 1 μl . Teoretická molekulová hmotnost proteinu AfGcHK na základě aminokyselinové sekvence proteinu AfGcHK je 43 kDa. Z nanesených vzorků bakteriálních proteinů pro indukcí (dráhy 3, 6 a 8, obrázek 18, strana 55) je naprosto jasné, že vlivem přídavku IPTG do kultivačního media dochází k masivní expresi proteinu s molekulovou hmotností okolo 42 kDa (viz vyznačená šipka na obrázku 18, strana 55). Na základě podobnosti molekulových hmotností můžeme předpokládat, že tento masivně exprimovaný protein je AfGcHK. Na základě vysoké koncentrace proteinu AfGcHK ve vzorku lze předpokládat, že jeho produkce pomocí buněk *E. coli* BL-21(DE3) je velmi efektivní. Ve vzorcích proteinů odebraných před indukcí se nenachází prakticky žádný protein AfGcHK (dráhy 2, 5, 7, obrázek 18, strana 55). Nicméně identifikace případné bazální exprese proteinu AfGcHK v komplexní směsi dalších bakteriálních proteinů je

značně obtížná. Pravděpodobně ale nedochází k bazální expresi T7 RNA polymerasy a protein *AfGcHK* byl exprimován až po přidání IPTG.



Obrázek 18: Kontrola exprese proteinu *AfGcHK* buňkami *E. coli* BL-21(DE 3) pomocí SDS elektroforesy v 12% gelu

- 1: Marker Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, 3 μ l
- 2: Buňky *E. coli* BL-21 (DE 3) před indukcí IPTG, 5 μ l
- 3: Buňky *E. coli* BL-21 (DE 3) po indukcí IPTG, 5 μ l
- 4: Marker Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, 3 μ l
- 5: Buňky *E. coli* BL-21 (DE 3) před indukcí IPTG, 3 μ l
- 6: Buňky *E. coli* BL-21 (DE 3) po indukcí IPTG, 3 μ l
- 7: Buňky *E. coli* BL-21 (DE 3) před indukcí IPTG, 1 μ l
- 8: Buňky *E. coli* BL-21 (DE 3) po indukcí IPTG, 1 μ l

4.3 Izolace proteinu *AfGcHK* z buněk *E. coli* BL-21(DE3)

Byla provedena izolace hem-obsahujícího sensorového proteinu *AfGcHK*. Postup této izolace je uveden v kapitole 3.3.5. V průběhu izolace byly odebírány vzorky, aby bylo možné vyhodnotit efektivitu jednotlivých kroků izolace (viz tabulka 2, strana 45). Odebrané vzorky byly analyzovány metodou SDS-PAGE (viz kapitola 3.3.6). Teoretická molekulová hmotnost proteinu *AfGcHK*, na základě aminokyselinové sekvence proteinu *AfGcHK*, je 43 kDa. Finální zakoncentrovaný vzorek proteinu *AfGcHK* (dráha 12 na obrázku 19, strana 58) byl na elektroforetický gel nanesen v příliš vysoké koncentraci, odečtení molekulové hmotnosti tohoto finální vzorku proteinu je proto obtížné. Nicméně na SDS-PAGE je mobilita finálního preparátu srovnatelná s molekulovou hmotností standardu s molekulovou hmotností 42 kDa (dráha 15, obrázek 19, strana 58). To je v souladu s předpokladem, že molekulová hmotnost izolovaného proteinu se nachází

v oblasti kolem 40 kDa. Vzorky pro elektroforesu odebrané z preparátu před zakoncentrováním finálního proteinu (dráha 9, obrázek 19, strana 58) obsahují nižší koncentraci proteinu (jsou více naředěny). Molekulová hmotnost tohoto proteinu je proto na elektroforetickém gelu snadněji identifikovatelná. Porovnáním mobility nezakoncentrovaného proteinu s mobilitou markeru (42 kDa), byla získána informace o přibližné molekulové hmotnosti tohoto proteinu. Hodnota této molekulové hmotnosti se pohybuje v oblasti 42 kDa. Lze proto předpokládat, že tímto proteinem je *AfGcHK*. Zdá se tedy, že izolace proběhla úspěšně a protein získaný izolací je protein *AfGcHK*.

Do jamek 1 a 2 elektroforetického gelu byly nanášeny vzorky partikulární frakce (membrány, inkluzní tělíska atd.) odebrané po sonikaci a dvojnásobné centrifugaci buněk. V drahách 1 a 2 (obrázek 19, strana 58) je vidět velké množství různých balastních proteinů, které byly obsaženy v této frakci a zároveň velké množství proteinu *AfGcHK*. Znamená to, že přibližně 50% proteinu *AfGcHK* zůstalo navázáno na partikulární buněčné struktury nebo v inkluzních těliscích. Ztráta části izolovaného proteinu během izolace, zvláště při použití sonikace je běžná [14]. I přes tuto ztrátu bylo ve vzorku supernatantu cytosolární frakce (dráha 3, obrázek 19, strana 58) obsaženo dostatečné množství proteinu *AfGcHK* pro další izolaci.

K oddělení proteinu *AfGcHK* od ostatních složek cytosolu byla použita afinitní chromatografie, kdy bylo využito vazby imidazolové skupiny histidinu (protein *AfGcHK* nese na svém C konci 6 histidinů tzv. histidinová kotva nebo-li „His-tag“) s přechodným kovem (kobaltnatý iont obsažený v afinitním gelu). Vzorek frakce proteinů, které se na afinitní gel nenavázaly ani po 60 minutové inkubaci, byl nanášen do dráhy 4 (obrázek 19, strana 58).

Mezi nenavázanými proteiny se nachází i izolovaný protein *AfGcHK*. Vzhledem k úspěšně provedené izolaci proteinu *AfGcHK* je výskyt proteinu *AfGcHK* v této frakci zapříčiněn zřejmě nedostatečnou kapacitou použitého afinitního gelu.

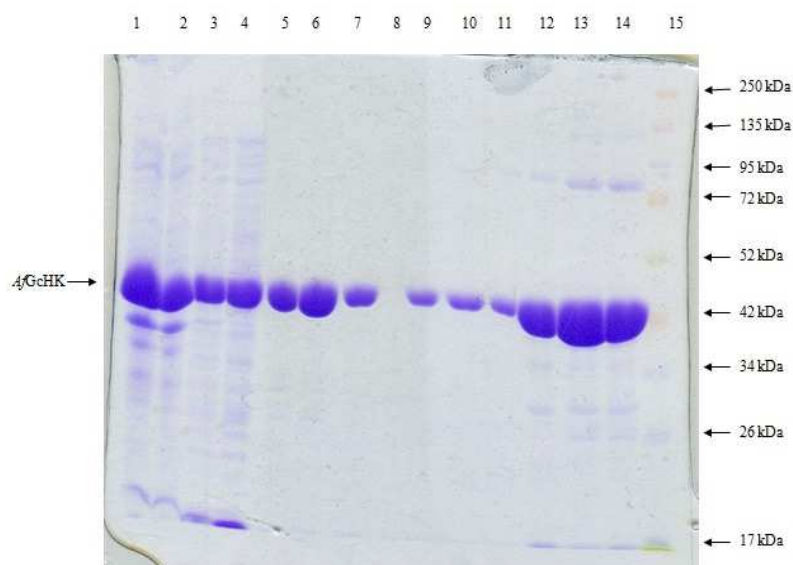
Z afinitního gelu byly nejprve vymyty balastní proteiny puřem bez imidazolu. Pro odstranění kontaminujících proteinů, které se na afinitní gel stále vázaly, byly použity roztoky imidazolu o nižších koncentracích (10 mM a 20 mM), zatímco pro eluci proteinu *AfGcHK* byl použit roztok imidazolu o vyšší koncentraci (200 mM). Roztok imidazolu je vzhledem k histidinové kotvě *AfGcHK* navázané na afinitním gelu kompetitivním činidlem. Vzorky směsí proteinů eluovaných výše popsáním způsobem byly nanášeny na jamky 5 (promytí 10 mM roztokem imidazolu), 6 (promytí 20 mM roztokem imidazolu) a

7 (promytí 200 mM roztokem imidazolu). Ve všech třech drahách (5, 6, 7, obrázek 19, strana 58) je patrný pouze jeden majoritní protein, a to *AfGcHK*. Tento protein je tedy možné z gelu odstranit již za použití roztoku imidazolu o nízké koncentraci (10 mM). Protože bylo předpokládáno, že největší podíl proteinu *AfGcHK* bude získán promytím 200 mM roztoku imidazolu, byl tento protein na elektroforetický gel nanášen v nižší koncentraci. Naproti tomu proteiny získané z afinitního gelu promytím 10 mM a 20 mM roztokem imidazolu byly naneseny ve větší koncentraci (přibližně v 6 krát větší koncentraci) (viz tabulka 2, strana 45). Nelze proto objektivně posoudit, v jaké z těchto frakcí (10 mM, 20 mM, 200 mM), se nachází největší podíl izolovaného proteinu *AfGcHK*. Lze pouze odhadovat, že největší množství proteinu *AfGcHK* bylo získáno promytím 20 mM roztoku imidazolu a nejmenší množství proteinu *AfGcHK* bylo získáno promytím 10 mM roztokem imidazolu.

Pro odstranění imidazolu z roztoků proteinů eluovaných různými koncentracemi imidazolu byla provedena dialýza proti základnímu pufru (20 mM Tris, pH 8,0). Po ukončení dialýzy byly roztoky proteinů podrobeny centrifugaci. Vzorek precipitátu byl nanesen na jamku 8 (obrázek 19, strana 58). V dráze 8 je velmi malé množství proteinů, zdá se tedy, že množství vyprecipitovaného proteinu v důsledku dialýzy je zanedbatelné. Vzorky supernatantů proteinů eluovaných různě koncentrovanými roztoky imidazolu byly naneseny na jamky 9 (eluce 200 mM imidazolem), 10 (eluce 20 mM imidazolem) a 11 (eluce 10 mM imidazolem). V tomto případě byly proteiny nanášeny ve stejných koncentracích. Lze proto lépe posoudit množství proteinu v jednotlivých eluovaných frakcích. Největší podíl proteinu *AfGcHK* byl získán promytím afinitního gelu 20 mM imidazolem. Nejmenší množství proteinu bylo získáno promytím afinitního gelu 10 mM imidazolem. V drahách číslo 10 a 11 (obrázek 19, strana 58) se nacházejí ještě další proteiny, které izolovaný protein *AfGcHK* kontaminují. Ty ovšem nejsou obsaženy v dráze číslo 9 (obrázek 19, strana 58). Tyto kontaminující proteiny jsou z gelu eluovány již 10 mM a 20 mM roztokem imidazolu a ve frakci eluované 200 mM imidazolem již proto nejsou obsaženy (dráha 9, obrázek 19, strana 58).

Posledním krokem izolace proteinu *AfGcHK* bylo jeho zakoncentrování. Vzorky zakoncentrovaných proteinů byly naneseny na jamky 12 (eluce 200 mM imidazolem), 13 (eluce 20 mM imidazolem) a 14 (eluce 10 mM imidazolem). Zakoncentrovaný protein *AfGcHK* vytváří na elektroforetickém gelu velmi výraznou stopu. A to i přesto, že objemové množství naneseného proteinu bylo oproti předchozím (dráhy 1 – 11, obrázek

19) nanášeným objemovým množstvím nižší (viz tabulka 2, strana 45). Bylo tedy vyizolováno velké množství proteinu AfGcHK a to i přes to, že během sonikačního kroku izolace došlo ke značným ztrátám. Během zakoncentrování proteinu AfGcHK byly zakoncentrovány i ostatní proteiny nacházející se v různých oblastech elektroforetického gelu. Oproti dráze 9 (obrázek 19), kde tyto proteiny viditelné nejsou, na dráze 12 (obrázek 19) jsou znatelné. Tyto proteiny byly tedy vymyty z afinitního gelu i při použití 200 mM roztoku imidazolu, ale v menším množství než při použití 10 mM a 20 mM roztoku imidazolu.

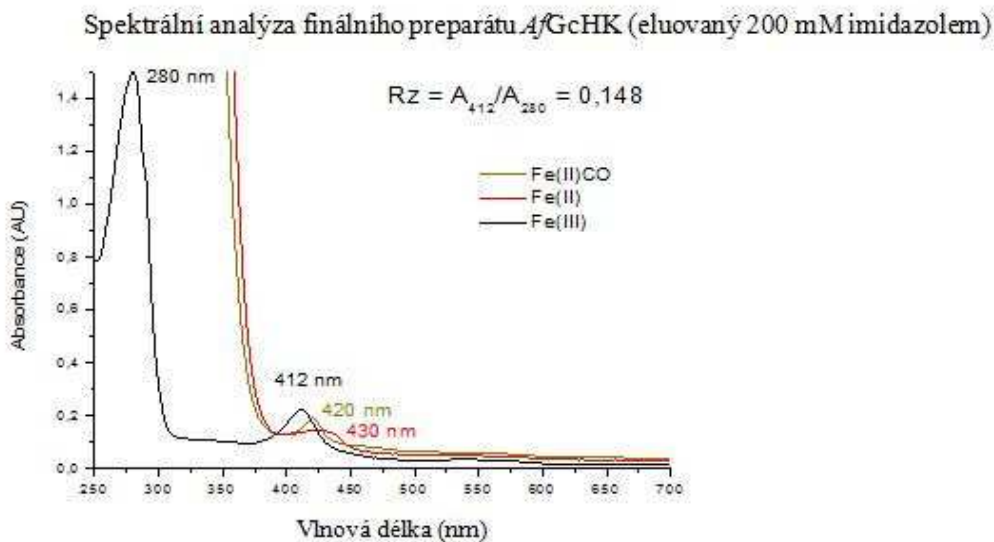


Obrázek 19: Izolace proteinu AfGcHK

V jednotlivých drahách 1 – 14 jsou nanášeny následující vzorky po 5 μ l, připravené podle tabulky 2 v kapitole 3.3.5, v dráze 15 je nanášeno 5 μ l markeru

- 1: Vzorek partikulární frakce č. 1
- 2: Vzorek partikulární frakce č. 2
- 3: Vzorek supernatantu cytosolární frakce
- 4: Vzorek cytosolární frakce, nevázané na afinitní gel
- 5: Vzorek eluovaný z kolony 10 mM roztokem imidazolu
- 6: Vzorek eluovaný z kolony 20 mM roztokem imidazolu
- 7: Vzorek eluovaný z kolony 200 mM roztokem imidazolu
- 8: Vzorek precipitátu po dialýze
- 9: Vzorek neprecipitující frakce (eluovaný 200 mM roztokem imidazolu)
- 10: Vzorek neprecipitující frakce (eluovaný 20 mM roztokem imidazolu)
- 11: Vzorek neprecipitující frakce (eluovaný 10 mM roztokem imidazolu)
- 12: Zakoncentrovaný vzorek (eluovaný 200 mM roztokem imidazolu)
- 13: Zakoncentrovaný vzorek (eluovaný 20 mM roztokem imidazolu)
- 14: Zakoncentrovaný vzorek (eluovaný 10 mM roztokem imidazolu)
- 15: Marker SpectraTM Multicolor Broad Range Protein Ladder

Finální preparát izolovaného proteinu (eluovaný 200 mM imidazolem) byl primárně charakterizován spektrometrickým měřením. Vzorek byl 100x naředěn 20 mM Tris, pH 8,0 a bylo měřeno spektrum v rozsahu 250 – 700 nm (obrázek 20, černá křivka). Další spektrum bylo zaznamenáno po redukcí dithioničitanem sodným (obrázek 20, červená křivka) a poslední spektrum obsahovalo redukovaný preparát vystavený působení oxidu uhelnatého po dobu 5 minut (obrázek 20, žlutá křivka). RZ poměr (A_{412}/A_{280}), který vyjadřuje zastoupení molekul hemu navázaného na protein, byl 0,148. Pokud se protein *AfGcHK* vyskytuje ze 100% jako holoforma, je hodnota RZ poměru větší než 2,2 [39]. Izolovaný protein *AfGcHK* se tak vyskytuje z 97% jako apoforma. Při analýze holoformy proteinu *AfGcHK* bylo zjištěno, že její Soretův pás se vyskytuje v oblasti 412 nm (obrázek 20). Oblast Soretova pásu redukované formy hemu vázaného k holoproteinu je 430 nm a oblast Soretova pásu Fe(II) CO formy hemu vázaného k holoproteinu je 420 nm (obrázek 20). Tato získaná data jsou v pozitivní korelaci s daty získanými v pilotní publikaci, studující protein *AfGcHK* [39]. Hem je tedy k proteinu *AfGcHK* navázán správně.



Obrázek 20: Spektrální analýza finálního preparátu *AfGcHK* (eluovaný 200 mM imidazolem)

100x ředěný vzorek (20 mM Tris, pH 8,0) finálního preparátu *AfGcHK* (černá křivka – Fe(III)), po redukcí dithioničitanem sodným (červená křivka Fe(II)), redukovaný preparát vystavený působení CO po dobu 5 minut (žlutá křivka Fe(II)-CO). V grafu jsou zvýrazněny hodnoty Soretova pásu jednotlivých forem proteinu. Na obrázku je dále vyznačena hodnota RZ poměru.

5 Diskuze

Obsahem této bakalářské práce je zpracování dosavadních vědeckých poznatků ohledně hem-obsahujících sensorových proteinů. Toto téma bylo zpracováno nejen jako shrnutí dosavadních literárních zdrojů, ale také byla provedena exprese a následná izolace modelového zástupce ze skupiny hem-obsahujících sensorových proteinů. Konkrétně se jedná o plyn-detekující protein *AfGcHK*. Tento protein byl objeven před nedávnou dobou a jeho studie jsou proto zatím pouze pilotní. Publikace, která se věnuje problematice izolace a následné charakterizaci proteinu *AfGcHK* existuje pouze jedna [39]. Při izolaci proteinu *AfGcHK* v rámci zpracování této bakalářské práce bylo proto čerpáno z dat, obsažených v této jediné publikaci. Následná charakterizace izolovaného proteinu *AfGcHK* pomocí spektroskopických studií se víceméně shoduje se spektroskopickými údaji, obsaženými v této publikaci [39].

Plasmid pET-21c(+)/*AfGcHK*, který byl poskytnut spolupracující laboratoří vedenou profesorem Toru Shimizu, byl namnožen a izolován. Následně byla ověřena jeho autentičnost pomocí restrikční analýzy, následované agarosovou elektroforesou. Výsledkem restrikční analýzy byly dva různě dlouhé úseky plasmidové DNA na agarosovém gelu. Mobilita a tudíž velikost těchto dvou fragmentů odpovídá počtu párů bází oběma specificky štěpeným částem plasmidové DNA. Izolace plasmidu pET-21c(+)/*AfGcHK* tak byla úspěšná. Byla provedena také agarosová elektroforesa neštěpeného vektoru pET21c(+)/*AfGcHK*. Výsledkem agarosové elektroforesy restrikčními endonukleasami neštěpeného cirkulárního plasmidu bylo rozdělení vzorku do dvou majoritních zón. Jejich mobilita však byla výrazně nižší než by odpovídalo stejně velkým lineárním úsekům. V této souvislosti je třeba si uvědomit, že u neštěpených cirkulárních molekul plasmidové DNA dochází často k výskytu různých strukturních forem v roztoku, které se od sebe výrazně liší kompaktností své struktury (např. relaxovaná forma, superhelikální forma, případně také lineární forma) [48]. Různé strukturní formy plasmidové DNA pak putují agarosovým gelem různou rychlostí v závislosti na prostorovém uspořádání více než v závislosti na konkrétní velikosti, pokud tuto velikost srovnáme s lineárními fragmenty DNA přítomnými v markeru. Z těchto úvah vyplývá, že plasmid pET-21c(+)/*AfGcHK* se nacházel v roztoku ve dvou majoritních formách (relaxovaná a superhelikální forma cirkulární plasmidové DNA) (viz obrázek 14, strana 50). Nelze tak v tomto případě porovnávat mobilitu těchto strukturních forem plasmidové

DNA s lineárními fragmenty DNA o známé velikosti ve vzorku markeru. Naproti tomu při štěpení plasmidu pET-21c(+)/*AfGcHK* vznikly dva lineární fragmenty původní cirkulární plasmidové DNA (viz obrázek 15, strana 51). V tomto případě je oprávněné srovnávat velikost těchto lineárních fragmentů s velikostí známých lineárních fragmentů ve vzorku markeru. Takovýto postup je běžně využíván [51].

Z obou provedených elektrofores (obrázek 14 a obrázek 15, strana 50, 51) navíc vyplývá, že izolovaný plasmid není kontaminován ani RNA, ani balastními proteiny. Ve shodě s tímto závěrem je navíc také spektrofotometrické ověření čistoty izolovaného plasmidu pET-21c(+)/*AfGcHK*, kdy je klíčový poměr hodnot absorbcí při vlnových délkách 260 a 280 nm A_{260}/A_{280} . Minimální hodnota tohoto poměru, kdy se dá o plasmidu předpokládat, že je neznečištěný proteiny, je 1,6. Hodnota výše uvedeného poměru absorbcí izolovaného plasmidu *AfGcHK* je 1,9. Izolovaný plasmid byl proto izolován ve velmi čisté formě a je možné ho použít např. i v komplikovanějších experimentech a dalších genových manipulacích využívající polymerázovou řetězovou reakci.

Dalším cílem bakalářské práce byla exprese a následná izolace proteinu *AfGcHK*. S expresí různých hem-obsahujících sensorových proteinů (např. HRI a YddV) má laboratoř, v rámci jejichž výzkumů byla zpracována tato bakalářská práce, bohaté zkušenosti, jak je dokumentováno v publikacích [14, 52]. Hem-obsahující sensorový protein *AfGcHK* je oproti proteinům HRI [14] a YddV [52] exprimován v překvapivě velkém množství. Exprese proteinů HRI [14] a YddV [52] je v porovnání s expresí proteinu *AfGcHK* nejméně o jeden až dva řády nižší.

Během izolace proteinu *AfGcHK* byla použita afinitní chromatografie. Za tímto účelem byl plasmid pET-21c(+)/*AfGcHK* konstruován tak, že na N-konci proteinu *AfGcHK* se nacházela histidinová kotva, která obsahovala sekvenci šesti histidinů. Během afinitní chromatografie pak bylo využíváno k zachycení proteinu *AfGcHK* právě této histidinové kotvy. Během chromatografie došlo k interakci mezi histidinovou kotvou a přechodným kovem (Co^{2+}) vázaným v afinitním gelu. Po oddělení všech balastních proteinů byl protein *AfGcHK* z afinitního gelu eluován pomocí různých koncentrací roztoku imidazolu (10 mM, 20 mM, 200 mM). V každé z těchto frakcí bylo eluováno různé množství proteinu *AfGcHK* a také různé množství zbývajících balastních proteinů. Překvapivě největší množství proteinu *AfGcHK* bylo eluováno pomocí 20 mM roztoku imidazolu, přestože v původním izolačním návodu byla doporučena eluce 200 mM roztokem imidazolu [39]. Protein *AfGcHK* je tak velmi dobře eluován již 20 mM

koncentrací imidazolu. Nejmenší množství proteinu *AfGcHK* bylo podle předpokladu a ve shodě s pilotní publikací [39] z afinitního gelu eluováno pomocí 10 mM roztoku imidazolu. Jak frakce eluovaná 10 mM imidazolem, tak také frakce eluovaná 20 mM imidazolem však obsahovaly i jiné balastní proteiny. Pravděpodobně se jedná o přirozené bakteriální proteiny s vysokým zastoupením histidinových zbytků v jejich molekulách [53]. Tyto bakteriální proteiny jsou z afinitního gelu vymyty již nízkými koncentracemi roztoku imidazolu, proto se ve frakci vymyté 200 mM roztokem imidazolu vyskytují ve velmi malém množství a na elektroforetickém gelu jsou v tomto preparátu viditelné až po výrazném zkoncentrování (obrázek 19, strana 58). Nicméně, i po tomto zkoncentrování je protein *AfGcHK* oproti těmto bakteriálním proteinům ve výrazném nadbytku. Finální preparát proteinu *AfGcHK* (eluovaný 200 mM imidazolem) byl tedy izolován ve vysoké čistotě – protein *AfGcHK* tvoří více než 99% izolovaného preparátu.

Z hlediska největší výtěžnosti proteinu *AfGcHK* je nejvýhodnější po afinitní chromatografii spojit frakce získané elucí 20 mM a 200 mM roztoku imidazolu. Takto získaný preparát však bude znečištěn jinými (pravděpodobně bakteriálními) proteiny a čistota (homogenita) takového preparátu klesne z 99% na 95%. Nicméně 95% preparát *AfGcHK* lze stále považovat za velmi vysoce purifikovaný a vhodný pro řadu dalších experimentů (např. spektroskopické studie, enzymovou analýzu atd.). Naopak, pokud je kladen důraz na izolaci naprosto čistého proteinu *AfGcHK* je výhodnější použít k eluci proteinu *AfGcHK* z afinitního gelu až 200 mM roztok imidazolu a afinitní gel nejprve promýt 10 mM a 20 mM roztokem imidazolu i za cenu ztráty části izolovaného proteinu *AfGcHK* spolu s balastními proteiny. Takto vysoce purifikovaný preparát dosahuje čistoty (homogenity) až 99% (a je možné ho využít např. pro krystalografii). Při použití 10 mM roztoku imidazolu je výtěžek proteinu *AfGcHK* výrazně nižší ve srovnání s použitím více koncentrovaného roztoku imidazolu, zároveň je tímto roztokem imidazolu vymyto z afinitního gelu také nejvíce proteinových nečistot. Jeho nejideálnější využití je tedy pro eluci kontaminujících proteinů z afinitního gelu.

Podle elektroforetické analýzy (viz obrázek 19, strana 58) nebylo na afinitní gel navázáno kvantitativně všechno množství izolovaného proteinu *AfGcHK* přítomného v cytosolu. Podle výrobce má 1 ml tohoto gelu vazebnou kapacitu 5 mg proteinu obsahujícího histidinovou kotvu [54]. Protože bylo předpokládáno, že protein *AfGcHK* bude exprimován v podobném množství jako plyn-detekující protein YddV [52], bylo použito ekvivalentní množství afinitního gelu jako při izolaci proteinu YddV. Protein

AfGcHK je však exprimován v mnohem větším množství než protein YddV a použité množství gelu (3 ml) tak bylo nedostačující. Pro efektivnější izolaci proteinu *AfGcHK* ze stejného množství produkčních buněk je tak nutné použít minimálně dvakrát větší objem afinitního gelu.

Pro pilotní charakterizaci izolovaného proteinu *AfGcHK* byl tento protein podroben spektrofotometrické analýze a výsledky byly porovnány s publikovanou studií proteinu *AfGcHK* [39]. V publikované studii [39] bylo zjištěno, že protein *AfGcHK* má Rz poměr (A_{412}/A_{280}) větší než 2,2. Rz poměr proteinu *AfGcHK* izolovaného v rámci této bakalářské práce je pouze 0,148 a tedy se vyskytuje ve své holoformě pouze z 3%. Zatímco autoři uvedené publikace získali analogickým izolačním postupem protein *AfGcHK* v prakticky 100% holoformě [39]. Důvodem této diskrepance může být mutovaná aminokyselina na místě, kde dochází k vazbě hemu. Bylo by tedy vhodné otestovat aminokyselinové složení sensorové domény proteiny *AfGcHK* a případné mutace odstranit. Tato možnost se však jeví nepravděpodobná, protože 3% proteinu s vázaným hemem, vykazuje správnou koordinaci podle Sorretova pásu při 411 nm (obrázek 20, strana 59). Další možností nízkého zastoupení holoformy proteinu je nízká koncentrace přidaného hemu, která mohla být nedostatečná, nebo použitý hem mohl být dokonce degradovaný. Fakt, že je hem vázán na izolovaný protein *AfGcHK* v tak malém množství, může být vysvětlen i nedostatečným rozpuštěním přidávaného hemu. V případě izolace proteinu *AfGcHK* byl jako rozpouštědlo hemu použit dimethylsulfoxid, zatímco při izolaci proteinu HRI se běžně využívá 0,1 M NaOH a k problému s ligací hemu k proteinu nedochází [14]. Problém s vazbou hemu k proteinu by tedy mohl být vyřešen změnou rozpouštědla hemu. Nicméně protein *AfGcHK* byl izolován ve vysokém výtěžku a čistotě a jeho intenzivní studium je plánováno v rámci navazujícího magisterského studia.

6 Závěr

Předkládaná bakalářská práce se zabývá studiem hem-detekujících senzorových proteinů, konkrétně modelovým kyslík detekujícím proteinem *AfGCHK*. Stanovené cíle této bakalářské práce byly naplněny. Konkrétně bylo dosaženo následujících výsledků:

1. Na stranách 11-31 je provedena rešerše dosavadních výsledků vědeckých studií, týkajících se daného tématu.
2. Byl úspěšně amplifikován a izolován plasmid pET-21c(+)/*AfGCHK*. V celkovém objemu 60 μ l bylo získáno 110,4 μ g dané plasmidové DNA ve třech paralelních vzorcích. Plasmid byl dále charakterizován restriční analýzou a agarosovou elektroforesou. Charakterizace potvrdila, že izolovaný plasmid je skutečně pET-21c(+)/*AfGCHK*.
3. Pomocí SDS elektroforesy byla potvrzena úspěšnost exprese proteinu *AfGCHK* v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) po indukci IPTG. Z celkového objemu 4 l TB media bylo získáno 35 g buněk *E. coli* BL-21(DE3), které obsahovaly exprimovaný protein *AfGCHK*.
4. Ze 17 g buněk *E. coli* BL-21(DE3) s exprimovaným proteinem *AfGCHK* byl tento protein úspěšně izolován a jeho čistota byla více než 99%, což bylo potvrzeno pomocí SDS elektroforesy.
5. Byla navržena optimalizace izolačního postupu.
6. Pilotní charakterizací izolovaného proteinu *AfGCHK* bylo zjištěno, že většina proteinu získaného izolací byla ve formě apoproteinu, tedy bez ligovaného hemu. V budoucnu bude třeba postup izolace ještě dále optimalizovat.

Seznam použitých zdrojů

1. Šípal Z., Anzenbacher P., Peč P., Pospíšil J., Růžička I.: Biochemie, Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 1992
2. Murray R., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.: Harperova biochemie, 4. vydání, Nakladatelství H + H, Jinočany, 2002
3. protoporfyrin URL:
http://orion.chemi.muni.cz/zakladni_pojmy_z_biochemie/page0220.htm, stav ze dne 19.4.2012
4. hem URL: <http://www.biology.estranky.cz/clanky/vzorce-sloucenin/pismeno-h.html>, stav ze dne 19.4 2012
5. Kolektiv autorů: Biochemie základní kurz, Nakladatelství Karolinum, Praha, 2009
6. Igarashi J., Kenichi K., Martinkova M., Murase M., Iizuka A., Shimizu T.: Acta. Chim. Slov., **55**, 67-74 (2008)
7. Hirai M., Martinkova M., Igarashi J., Saiful I., Yamauchi S., El-Mashtoly S., Kitagawa T., Shimizu T.: J. Inorg. Biochem., **101**, 1172-1179 (2007)
8. Sousa E. H. S., Tuckerman J. R., Gonzales G., Gilles-Gonzales M. A.: Biochemistry, **46**, 6249-6257 (2007)
9. Igarashi J., Kenichi K., Shimizu T.: Emerging Roles of Heme as a Signal and a Gas-Sensing Site: Heme-sensing and Gas-Sensing Proteins v knize Handbook of Porphyrin Science, svazek 15, 399-460, World Scientific Publishing, Hackensack, NJ, USA, 2010
10. Voet D., Voetová J. G.: Biochemie, Victoria Publishing, Praha 1, 1995
11. Shimizu T.: J. Inorg. Biochem., **108**, 171-177 (2012)
12. Zhang L., Guarente L.: EMBO J., **14**, 313-320 (1995)
13. Lee H. C., Hon T., Zhang L.: Mol. Cell. Biol., **23**(16), 5857-5866 (2003)
14. Miksanova M., Igarashi J., Minami M., Sagami I., Yamauchi S., Kurokawa H., Shimizu T.: Biochemistry, **45**, 9894-9905 (2006)
15. Mukaiyama Y., Uchida T., Sato E., Sasaki A., Sato Y., Igarashi J., Kurokawa H., Sagami I., Kitagawa T., Shimizu T.: FEBS J., **273**, 2528-2539 (2006)
16. Hargrove M. S., Singleton E. W., Quillin M. L., Ortiz L. A., Philips G. N., Olson J. S.: J. Biol. Chem., **269**, 4207-4214 (1994)

17. Igarashi J., Murase M., Iizuka A., Pichierri F., Martinkova M., Shimizu T.: *J. Biol. Chem.*, **283**, 18782-18791 (2008)
18. Kozak M.: Regulation of Protein Synthesis in Virus-Infected Animal Cells, v knize *Advances in Virus Research*, svazek 31, 229-292, Academic Press, California, USA, 1986
19. Flaim K. E., Liao W. S. L., Peavy D. E., Taylor J. M., Jefferson L. S.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 2939-2946 (1982)
20. Chen J-J.: *Blood*, **109**(7), 2693-2699 (2007)
21. Hershey J. W. B.: *J. Biol. Chem.*, **264**(35), 20823-20826 (1989)
22. Kimball S. R.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **31**, 25-29 (1999)
23. Dever T. E.: *Cell*, **108**, 545-556 (2002)
24. Han A., Fleming M. D., Chen J.: *EMBO J.*, **20**(23), 6909–6918 (2001)
25. Han A., Yu Ch., Lu L., Fujiwara Y., Browne C., Chin G., Fleming M., Leboulch P., Orkin S., Chen J.: *J. Clin. Invest.*, **115**(6), 1562-1570 (2005)
26. Yang J. M., London I. M., Chen J. J.: *J. Biol. Chem.*, **267**(28), 20519-20524 (1992)
27. Novotný J.: *Med. Pro Praxi*, **4**(11), 390–394 (2007)
28. Racek J.: *Klinická biochemie*, 2. vydání, Galén, Praha, 2006
29. Kapras J., Kohoutová M., Otová M.: *Kapitoly z lékařské biologie a genetiky I.*, Nakladatelství Karolinum, Praha, 1996
30. Ehrmann J., Hůlek P. a kolektiv: *Hepatologie*, Grada Publishing, Praha, 2010
31. Greenman Ch., et al.: *Nature (London, U. K.)*, **446**, 154 – 158 (2007)
32. Uchida T., Sato E., Sato A., Sagami I., Shimizu T., Kitagawa T.: *J. Biol. Chem.*, **280**, 21358-21368 (2005)
33. Taylor B. L., Zhulin I. B.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**(2), 479-506 (1999)
34. Gilles-Gonzales M. A., Ditta G. S., Helinski D. R.: *Nature (London, U. K.)*, **350**, 170-172 (1991)
35. Kaprálek F.: *Základy bakteriologie*, Nakladatelství Karolinum, Praha, 1999
36. Monson E. K., Ditta G. S., Helinski D. R.: *J. Biol. Chem.*, **270**, 5243-5250 (1995)
37. Ho Y-S. J., Burden L. M., Hurley J. H.: *EMBO J.*, **19** (20) 5288–5299 (2000)
38. Sousa E. H. S., Tuckerman J. R., Gonzales G., Gilles-Gonzales M. A.: *Protein Sci.*, **16**(8), 1708-1719 (2007)

39. Kitanishi K., Kobayashi K., Uchida T., Ishimori K., Igarashi J., Shimizu T.: *J. Biol. Chem.*, **286**, 35522-35534 (2011)
40. Zhang W., Phillips G. N. Jr.: *Structure (Oxford, U. K.)*, **11**, 1097-1110 (2003)
41. El-Mashtoly S. F., Gu Y., Yoshimura H., Yoshioka S., Aono S., Kitagawa T.: *J. Biol. Chem.*, **283**, 6942-6949 (2008)
42. Tagliabue L., Antoniani D., Maciag A., Bocci P., Garraelli N., Landini P.: *Microbiology (Reading, U. K.)*, **156**(10), 2901-2911 (2010)
43. Kojetin D. J., Sullivan D. M., Thompson R. J., Cavanagh J.: *Classification of Response Regulators Based on Their Surface Properties*, v knize *Methods in Enzymology*, svazek 422, 141 – 169, Academic Press, California, USA, 2007
44. mapa plasmidu URL: http://www.emdmillipore.com/life-science-research/vector-table-novagen-pet-vector-table/c_HdSb.s1O77QAAAEhPqsLdcab, stav ze dne 29. 4. 2012
45. Studier F. W., Moffatt A. B.: *J. Mol. Biol.*, **189**, 113 – 130 (1986)
46. Nishimura A., Morita M., Nishimura Y., Sugino Y.: *Nucleic Acids Res.*, **18**(20), 6169 (1990)
47. Robinson A. S.: *Production of Membrane Proteins: Strategies for Expression and Isolation*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2011
48. Coleman W. B., Tsongalis G. J.: *Molecular Diagnostic For The Clinical Laboratorian*, 2. vydání, Humana Press, New Jersey, USA, 2006
49. NEB pufr URL: <http://www.neb.com/nebecomm/products/productb7004.asp>, stav ze dne: 5. 5. 2012
50. Hochuli E., Bannwarth W., Döbeli H., Gentz R., Stüber D.: *Nat. Biotechnol.*, **6**, 1321-1325 (1988)
51. Milichovský J.: *Heterologní exprese a izolace lidských isoformů cytochromů P450 1A1/2*: Diplomová práce PŘF UK Praha, katedra biochemie, str. 60-77, 2011
52. Kitanishi K., Kobayashi K., Kawamura Y., Ishigami I., Ogura T., Nakajima K., Igarashi J., Tanaka A., Shimizu T.: *Biochemistry*, **49**, 10381-10393 (2010)53.
53. Wülfing C., Lombardero J., Plückthun A.: *J. Biol. Chem.*, **269**(4), 2895-2901 (1994)
54. afinitní gel URL: http://www.clontech.com/US/Products/Protein_Expression_and_Purification/His-Tagged_Protein_Purification/Cobalt_Resin-Batch, stav ze dne 7.5 2012