

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Veronika Fojtíková

Určení kinetických parametrů pro enzymovou reakci katalyzovanou
histidinkinasou s globinovou strukturou senzorové domény

The kinetic analysis of the enzyme reaction catalyzed by the globine
coupled histidine kinase

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Markéta Martínková, Ph.D.

Praha 2014

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 5. května 2014.

Poděkování

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

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Martinu Stráňavovi za jeho cenné rady a pomoc při řešení experimentální části této diplomové práce. V neposlední řadě děkuji také své rodině za neustálou podporu v době mého studia.

Abstrakt

Dvousložkové signální systémy, které se vyskytují především u bakterií, na základě signálu z okolí ovlivňují mnohé buněčné procesy. Typický dvousložkový signální systém je tvořen histidinkinásou a proteinem regulujícím odpověď (RR proteinem). Histidinkinasa obsahuje sensorovou doménu, která zachytí signál a katalytické jádro, na němž dochází prostřednictvím γ -fosfátového zbytku z hydrolyzovaného ATP k fosforylaci konzervovaného histidinu. Po takovéto aktivaci je fosfátová skupina z histidinkinasy přenesena na konzervovaný aspartátový zbytek RR proteinu. Tím je RR protein aktivován a je schopen vykonat svou funkci (obvykle se jedná o transkripční nebo enzymovou aktivitu), čímž reguluje mnohé buněčné procesy. Sensorová doména histidinkinasy je uzpůsobená pro vazbu konkrétní molekuly. Předkládaná diplomová práce se zabývá studiem unikátní histidinkinasy, jejíž sensorová doména obsahuje globinovou strukturu s vázanou molekulou hemu a jejím příslušným RR proteinem. Konkrétně se jedná o histidinkinasu s globinovou strukturou sensorové domény, izolovanou z *Anaeromyxobacter sp.*, kmen Fw 109-5 (*AfGcHK*).

Hlavním úkolem této diplomové práce bylo studium fosforylačních mechanismů *AfGcHK* a RR proteinu, vysvětlení jejich mechanismu působení a následné stanovení kinetických parametrů autofosforylační reakce *AfGcHK*. Pro sledování efektivity fosforylačních reakcí byla použita speciální modifikace diskontinuální elektroforesy na polyakrylamidovém gelu s přidavkem Phos-tagu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného. Bylo prokázáno, že RR protein má autofosforylační aktivitu a fosforamidát může sloužit jako donor fosfátu pro tuto enzymovou reakci. Nicméně fosforylovaná forma *AfGcHK* je mnohem lepším donorem fosfátu pro RR protein. Byl popsán efekt hořečnatých a vápenatých kationtů na autofosforylační aktivitu *AfGcHK* a RR proteinu. Kinetické parametry autofosforylační reakce *AfGcHK* byly stanoveny pro reakci za přítomnosti i absence hořečnatých kationtů a v případě absence hořečnatých kationtů také v přítomnosti RR proteinu.

Klíčová slova: dvousložkové signální systémy, histidinkinasa, RR protein, Phos-tag, nízkomolekulární donory fosfátu, *AfGcHK*

Abstract

Two-component signal systems serve as basic stimulus-response coupling mechanism to allow organisms (predominantly bacteria) to sense and respond to changes in many environmental conditions. The prototypical system consists of two proteins, namely a histidine kinase, containing a sensor domain and catalytic kinase core, and a response regulator protein (RR protein). Extracellular stimuli are sensed by a histidine kinase sensor domain. Then ATP is bound to the catalytic kinase core and the γ -phosphoryl group is transferred to the conserved histidine residue. This phosphoryl group is subsequently transferred to a conserved aspartate residue within the RR protein. Phosphotransfer to the RR protein results in activation of a downstream effector domain that elicits the specific response (usually it is transcription activity, but a few RR proteins function as enzymes). The histidine kinase sensor domain is designed for specific ligand interactions. This master thesis focused on the unique histidine kinase containing a sensor domain with a globine structure, which coordinates a heme molecule, namely globin-coupled histidine kinase from *Anaeromyxobacter* sp. Fw 109-5 (*AfGcHK*) and its appropriate RR protein.

The aim of this thesis was to study and characterize the phosphorylation activity of *AfGcHK* and RR proteins. Moreover, we tried to shed more light on the mechanism of the abovementioned phosphorylation processes. Finally, we focused on the examination of the kinetics parameters of autophosphorylation reaction of *AfGcHK*. For detection and quantification of phosphorylated proteins the polyacrylamid gel electrophoresis with Phos-tag in the presence of sodium dodecyl sulfate was used. It was found that RR protein has enzyme autophosphorylation activity and the low molecular phosphodonor phosphoramidate can serve as a substrate for this reaction. However the phosphoform of *AfGcHK* seems to be a much better substrate for RR protein compare to phosphoramidate. Kinetic parameters of autophosphorylation reaction of *AfGcHK* were determined in the presence of magnesium ions, in the absence of magnesium ions and finally in the absence of magnesium ions and in the presence of RR protein.

Key words: two component signal systems, histidine kinase, RR protein, Phos-tag, low molecular phosphodonors, *AfGcHK*

(InCzech)

Obsah

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	10
1 TEORETICKÝ ÚVOD.....	15
1.1 Dvousložkové signální systémy	15
1.1.1 Struktura a funkce dvousložkových signálních systémů.....	17
1.1.1.1 Histidinkinasa.....	17
1.1.1.1 RR protein	19
1.2 Proteiny detekující plyn	23
1.2.1 Proteiny detekují kyslík.....	24
1.2.1.1 PAS doména.....	25
1.2.1.2 GAF doména	29
1.2.1.3 Globinová doména	30
1.3 Metody používané pro detekci fosforylovaných forem HK a RR proteinu	33
1.3.1 Diskontinuální elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného obsahující Phos-tag	34
1.4 Plasmid pET-21c(+)	35
1.5 Plasmid pGEX-6P-2.....	36
2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	38
3 MATERIÁL A METODY.....	39
3.1 Použité přístroje.....	39
3.2 Použitý materiál a chemikálie	40
3.3 Použité metody	41
3.3.1. Příprava agarových ploten.....	41
3.3.2 Transformace buněk <i>E. coli</i> BL-21 (DE3) teplotním šokem.....	41
3.3.3 Exprese proteinu AfGcHK a RR proteinu	42
3.3.3.1 Kultivace buněk <i>E. coli</i> BL-21(DE3).....	42
3.3.3.2 Indukce exprese genu kódující protein AfGcHK/RR protein	43
3.3.4 Izolace proteinu AfGcHK z buněk <i>E. coli</i> BL-21(DE3).....	43

3.3.5 Izolace RR proteinu z buněk <i>E. coli</i> BL-21(DE3)	45
3.3.6 Stanovení koncentrace hemu v holoforně proteinu AfGcHK	46
3.3.7 Stanovení Rz poměru	46
3.3.8 Stanovení koncentrace proteinů metodou využívající přítomnost bicinchoninové kyseliny v reakčním činidle.....	47
3.3.9 Diskontinuální elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE).....	47
3.3.10 Diskontinuální elektroforesa na polyakrylamidovém gelu obsahujícím Phos-tag v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE-Phos-tag)	48
3.3.11 Optimalizace podmínek pro studium enzymových reakcí proteinu AfGcHK	50
3.3.11.1 Teplotní závislost autofosforylace AfGcHK	50
3.3.11.2 Časová závislost autofosforylace AfGcHK.....	50
3.3.11.3 Závislost autofosforylace AfGcHK na pH prostředí	51
3.3.12 Optimalizace podmínek pro studium procesu fosforylace RR proteinu.....	52
3.3.12.1 Teplotní závislost stupně fosfotransferu na RR protein.....	52
3.3.12.2 Časová závislost stupně fosfotransferu na RR protein	52
3.3.12.3 Závislost stupně fosfotransferu na RR protein na pH prostředí.....	52
3.3.13 Studium mechanismu histidinkinase AfGcHK a fosfotransferu na RR protein	53
3.3.13.1 Studium vlivu dvojmocných kationtů na autofosforylacii AfGcHK a na fosforylacii RR proteinu	53
3.3.13.2 Separace P-AfGcHK od nefosforylované formy AfGcHK pomocí iontové výměnné chromatografie	54
3.3.13.3 Odstranění nukleotidů (ATP, ADP) ze směsi P-AfGcHK, AfGcHK pomocí gelové filtrační chromatografie	55
3.3.13.4 Popis vlastností RR proteinu a mechanismu participace RR proteinu na své fosforylacii	56
3.3.14 Studium využití donorů fosfátu (jiných než P-AfGcHK) jako substrátů pro fosfotransfer na RR protein	58
3.3.14.1 Studium vlivu fosfoenolpyruvátu na fosforylační proces RR proteinu	58
3.3.14.2 Studium vlivu acetylfosfátu na fosforylační proces RR proteinu	58
3.3.14.3 Příprava fosforamidátů	59
3.3.14.4 Studium vlivu fosforamidátů na fosforylační proces RR proteinu	59
3.3.14.5 Studium vlivu ATP na fosforylační proces RR proteinu	61
3.3.14.6 Studium vlivu nehydrolyzovatelného analogu ATP - adenosin 5'-(β,γ-imido)trifosfátu (ATP ^A) na fosforylační proces RR proteinu.....	61
3.3.15 Stanovení kinetických parametrů enzymové reakce AfGcHK	62
3.3.15.1 Studium závislosti autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP	62
3.3.15.2 Studium závislosti autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP v nepřítomnosti hořečnatých kationtů.....	62
3.3.15.3 Studium závislosti autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP v přítomnosti RR proteinu a v nepřítomnosti hořečnatých kationtů	63

3.3.16 Studium závislosti autofosforylace <i>AfGcHK</i> v přítomnosti hořečnatých kationtů a v přítomnosti RR proteinu	63
3.3.17 Určení kinetických parametrů	63
4 VÝSLEDKY	65
4.1 Optimalizace protokolu heterologní exprese a izolačního postupu <i>AfGcHK</i> za účelem maximální saturace <i>AfGcHK</i> hemem (příprava plné holoformy <i>AfGcHK</i>)	65
4.2 Izolace RR proteinu z buněk <i>E.coli</i> BL-21(DE3)	68
4.3 Optimalizace metody SDS-PAGE-Phos-tag pro studium enzymových reakcí	69
4.4 Optimalizace podmínek pro studium enzymových reakcí proteinu <i>AfGcHK</i>.....	70
4.4.1 Teplotní závislost autofosforylace <i>AfGcHK</i>	70
4.4.2 Časová závislost autofosforylace <i>AfGcHK</i>	71
4.4.3 Závislost autofosforylace <i>AfGcHK</i> na pH prostředí.....	73
4.5 Optimalizace podmínek pro studium procesu fosforylace RR proteinu	74
4.5.1 Teplotní závislost fosforylace RR proteinu	74
4.5.2 Časová závislost fosforylace RR proteinu.....	76
4.5.3 Závislost fosforylace RR proteinu na pH prostředí	77
4.6 Studium mechanismu histidinkinasové reakce <i>AfGcHK</i> a fosfotrasferu na RR protein	79
4.6.1 Studium vlivu dvojmocných kationtů na autofosforylaci <i>AfGcHK</i> a na fosforylaci RR proteinu	79
4.6.2 Popis vlastností a mechanismu participace RR proteinu na své fosforylaci.....	81
4.6.3 Studium využití různých donorů fosfátu (jiných než P- <i>AfGcHK</i>) jako substrátů pro fosfotransfer na RR protein.....	83
4.6.4 Stanovení kinetických parametrů autofosforylační aktivity RR proteinu při použití fosforamidátu jako substrátu	88
4.7 Stanovení kinetických parametrů enzymové reakce <i>AfGcHK</i>.....	90
4.7.1 Studium závislosti autofosforylace <i>AfGcHK</i> na koncentraci ATP.....	90
4.7.2 Studium závislosti autofosforylace <i>AfGcHK</i> na koncentraci ATP v nepřítomnosti hořečnatých kationtů	92
4.7.3 Studium závislosti autofosforylace <i>AfGcHK</i> na koncentraci ATP v přítomnosti RR proteinu a v nepřítomnosti hořečnatých kationtů	95
4.8 Studium závislosti autofosforylace <i>AfGcHK</i> na koncentraci ATP v přítomnosti jak hořečnatých kationtů tak v přítomnosti RR proteinu.....	98
5 DISKUZE	100

6 ZÁVĚR	109
SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	111

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.

δ -ALA	aminolevulová kyselina
A/GcHK	histidinkinasa s globinovou strukturou sensorové domény izolovaná z bakterie <i>Anaeromyxobacter sp.</i> , kmen Fw 109-5
ArcB	histidinkinasa bakterie <i>Escherichia coli</i> podílející se na regulaci exprese v závislosti na přítomnosti kyslíku
ATP	adenosintrifosfát
ATP ^A	adenosin 5'-(β,γ -imido)trifosfát; nehydrolyzovatelný analog adenosintrifosfátu
AvGReg	diguanylátcyklasa s globinovou strukturou sensorové domény bakterie <i>Azobacter vinelandii</i>
AxPDEA1	fosfodiesterasa A1 bakterie <i>Acetobacter xylinum</i> , klíčový regulátor syntézy celulózy s PAS doménou
BIS	N,N-methylen-bis-akrylamid
BjFixL	FixL izolovaný z bakterie <i>Bradyrhizobium japonicum</i>
bp	párů bází
BpeGReg	diguanylátcyklasa s globinovou strukturou sensorové domény bakterie <i>Bordetella pertussis</i>
BvgA	RR protein podílející se na virulenci bakterie <i>Bordetella sp.</i>
CA	ATP-vázající katalytická doména
CitA	histidinkinasa bakterie <i>Klebsiella pneumoniae</i> s PAS doménou, která váže molekulu citrátu, interakcí s RR proteinem CitB ovlivňuje růst bakterie
CitB	RR protein bakterie <i>Klebsiella pneumoniae</i>
DesK	histidinkinasa bakterie <i>Bacillus subtilis</i> detekující fluiditu membránových lipidů

DevR	RR protein, který reguluje expresi genů, v závislosti na přítomnosti kyslíku v bakterii <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , spolu s DosS (resp. DosT)
DGC	diguanylátcyklasa
DHp	dimerizační a histidin fosfotransferová doména
DosS	protein detekující kyslík, obsahující GAF doménu, mající histidin kinasovou aktivitu, ovlivňuje v závislosti na přítomnosti kyslíku, oxidu uhelnatého a oxidu dusnatého v bakterii <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , spolu s DosS nebo DosT aktivitu transkripčního faktoru DevR
DosT	protein detekující kyslík, obsahující GAF doménu, mající histidin kinasovou aktivitu, ovlivňuje aktivitu transkripčního faktoru DevR
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EcDos	fosfodiesterasa bakterie <i>Escherichia coli</i> degradující cyklický di-guanosinmonofosfát, kyslíkový senzor s PAS doménou
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EnvZ	osmotický senzor bakterie <i>Escherichia coli</i> mající histidinkinasovou aktivitu
FAD	flavinadenindinukleotid
FixJ	RR protein bakterie <i>Sinorhizobium meliloti</i> s transkripční aktivitou
FixL	protein detekující kyslík s histidinkinasovou aktivitou bakterie <i>Sinorhizobium meliloti</i> , který reguluje expresi genů zodpovědných za fixaci dusíku prostřednictvím RR proteinu FixJ
FMN	flavinmononukleotid
GAF	strukturní motiv prostorového uspořádání proteinů; akronym odvozený z anglických názvů proteinů, ve kterých se tento strukturní motiv vyskytuje: „cGMP-specific phosphodiesterases“, „ <i>Anabaena</i> adenyl cyclases“ a „ <i>E. coli</i> formate hydrogenlyase transcriptional activator“

GCS	protein detekující kyslík s globinovou strukturou sensorové domény
GST	glutathion S-transferasa
HemAT	aerotaktický transduktor obsahující hem
HemDGC	diguanylátcyklasa s globinovou strukturou sensorové domény bakterie <i>Desulfotalea psychrophila</i>
HK	histidinkinasa
HK853	histidinkinasa bakterie <i>Thermotoga maritima</i>
HPt	fosfotransferový protein obsahující histidin
CheA	histidinkinasa ovlivňující prostřednictvím RR proteinu CheB, resp. CheY rotační směr pohybu bičíku
CheB	RR protein ovlivňující rotační směr pohybu bičíku
CheY	RR protein ovlivňující rotační směr pohybu bičíku
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid
KinA	histidinkinasa bakterie <i>Bacillus subtilis</i> detekující signály pro přechod do sporulačního stádia
LB medium	Luria Broth medium
MCP	chemotaktický protein přijímající metyl
NarL	RR protein bakterie <i>Escherichia coli</i> , který se prostřednictvím regulace genové exprese podílí na metabolismu dusičnanů
NifL	sensorový protein bakterie <i>Azobacter vinelandii</i> s PAS doménou obsahující flavinadenin dinukleotid, který monitoruje redoxní stav buňky
NRI	viz NtrC
NtrC	RR protein regulující expresi genů bakterie <i>Escherichia coli</i> v závislosti na přítomnosti dusíku
OmpR	RR protein regulující expresi genů bakterie <i>Escherichia coli</i> na základě osmolarity okolí
P-AfGCHK	fosforylovaná forma proteinu AfGCHK
P-RR protein	fosforylovaná forma RR proteinu

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“
PDE	fosfodiesterasa
P-HK	fosforylovaná forma histidinkinasy
PhoB	RR protein regulující expresi genů bakterie <i>Escherichia coli</i> v závislosti na přítomnosti fosfátové zbytku (P _i) v okolí
PhoQ	histidinkinasa bakterie <i>Escherichia coli</i> s PAS doménou, detekující koncentraci hořčnatých kationtů
pI	izoelektrický bod
PMSF	fenylmethansulfonyl florid
PYP	protein obsahující PAS doménu, fotosenzor fotosyntetizujících bakterií
RPM	počet otáček za minutu
RR protein	protein regulující odpověď
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SDS-PAGE-Phos-tag	diskontinuální elektroforesa na polyakrylamidovém gelu obsahujícím Phos-tag v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
Spo0F	RR protein, podílející se na expresi genů pro sporulaci <i>Bacillus subtilis</i>
TB medium	Terrific Broth medium
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylendiimin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UhpB	hisitidinkinasa bakterie <i>Escherichia coli</i> , která prostřednictvím svého substrátu UhpA reguluje vychytávání hexosafosfátů
YddV	diguanylátcyklasa s globinovou strukturou senzorové domény bakterie <i>Escherichia coli</i>

YPD1	fosfotrasferový protein obsahující histidin, kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , který se, v závislosti na osmotickém stresu, podílí na přenosu fosfátové skupiny z transmembránové histidinkinasy SLN1 a dále přenáší fosfátový zbytek na cytosolární RR protein SSK1
YtvA	fotosenzor bakterie <i>Bacillus subtilis</i> s PAS doménou vázající flavinmononukleotid

1 Teoretický úvod

1.1 Dvousložkové signální systémy

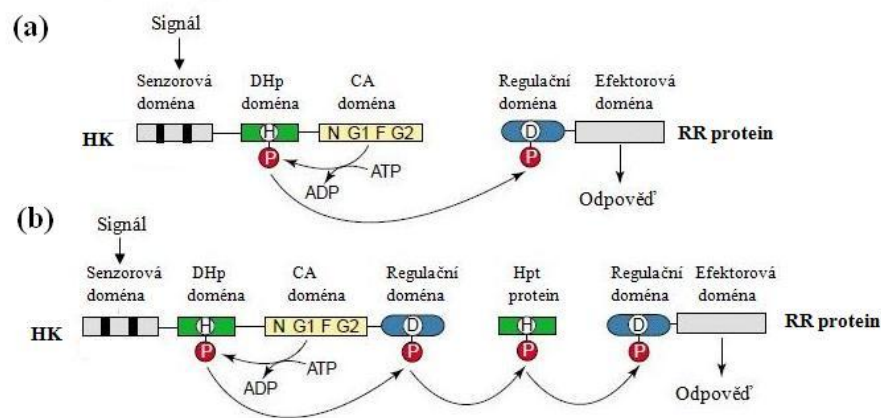
Dvousložkové signální systémy prostřednictvím extracelulárních podnětů regulují mnohé buněčné procesy, podílející se na správném fungování daného organismu [1]. Dvousložkové signální systémy byly nalezeny především u prokaryot [2], v menší míře také u některých eukaryot, vyjma živočišné říše [3]. U bakterií tak ovlivňují např. sporulaci [4], tvorbu biofilmu [5], virulenci [5], odpověď na stres [6], buněčné dělení [7].

Organismy jsou vystaveny neustálému působení fyzikálních vlivů a chemických látek, které mohou mít svůj původ v prostředí, kde se daný organismus vyskytuje, nebo mohou vznikat během metabolických procesů daného organismu [8]. Tyto signály (např. obsah živin [9], osmotické podmínky [10]) buňka rozpozná a reaguje na ně příslušnou odpovědí [11]. Odpovědi mohou mít jak dlouhodobý charakter (ovlivnění genové exprese) [10], tak krátkodobý charakter (změna pohyblivosti) [12]. Navzdory obrovské rozmanitosti podnětů a odpovědí je popsáno pouze malé množství molekulárních mechanismů, které jsou využívány při signalizaci. Jedním z těchto signálních mechanismů je fosforylace proteinů [13]. Zatímco u eukaryotních organismů dochází během signálních kaskád k fosforylaci příslušných kinas, které následně fosforylují své proteinové substráty na specifických místech, jakými jsou serinové, threoninové nebo tyrosinové zbytky [14], prokaryotní organismy využívají především výše zmíněné tzv. dvousložkové signální systémy [13].

Typický bakteriální dvousložkový systém je tvořen dvěma proteiny – histidinkinásou (HK) a tzv. proteinem regulujícím odpověď (RR protein z angl. „response regulator“) [15]. Různá organizace proteinů dvousložkových signálních systémů, umožňuje vyhodnocovat odlišné signály tak, aby byl stále zachován konzervovaný mechanismus fosforylace. Základní schéma slouží k ilustraci fosfotransferového přenosu, který je zastoupen jak v jednoduchých (obrázek 1A), tak ve složitějších propracovanějších systémech (obrázek 1B, strana 16) [13]. Stimulací HK signálem dochází k autofosforylaci jejího konzervovaného histidinového zbytku, a to prostřednictvím γ -fosfátového zbytku hydrolyzovaného ATP [12]. Fosfátový zbytek je následně přenesen z HK na RR protein (konkrétně na aspartátový zbytek). RR protein je touto fosforylací aktivován a je tak

schopen vykonávat svou funkci (obvykle je touto funkcí transkripční nebo enzymová aktivita [8]) a ovlivnit tak buněčnou odpověď [12].

Komplexnější verzí tohoto systému je his-asp-his-asp fosfátový přenos (obrázek 1B) [13], kdy je využíváno více transferových kroků a často více než dvou proteinů [16]. V těchto vícekrokových přenosech se velmi často vyskytují hybridní HK a fosfotransferový protein obsahující histidin (Hpt z angl. „His-containing phosphotransfer protein“) [13]. U těchto systémů nedochází po autofosforylaci konzervovaného histidinového zbytku HK k přenosu fosfátové skupiny na RR protein přímo, ale prostřednictvím další fosfotransferové domény s konzervovaným aspartátovým zbytkem [17]. Ta může být součástí HK [18] (takovéto HK se nazývají hybridní HK [13]) nebo se může vyskytovat jako samostatný protein [4]. Ve většině případů je fosfátový zbytek dále přenesen na Hpt [11] a konečně na aspartátový zbytek RR proteinu.



Obrázek 1: Schéma přenosu fosfátového zbytku u dvousložkových signálních systémů; upraveno dle [13]

a) Typický dvousložkový signální systém je tvořen histidinkinásou (HK) a proteinem regulujícím odpověď (RR proteinem). Po stimulaci sensorové domény signálem dochází k fosforylaci konzervovaného histidinu (H) dimerizační a fosfotrasferové (DHp) domény. Fosfát (P) je uvolněn hydrolyzou ATP, který je vázán k ATP-vázající katalytické (CA) doméně. Fosfátová skupina je poté přenesena na konzervovaný aspartátový zbytek (D) regulační domény RR proteinu. Tato fosforylace aktivuje efektorovou doménu, což v konečném důsledku vyvolá specifickou buněčnou odpověď.

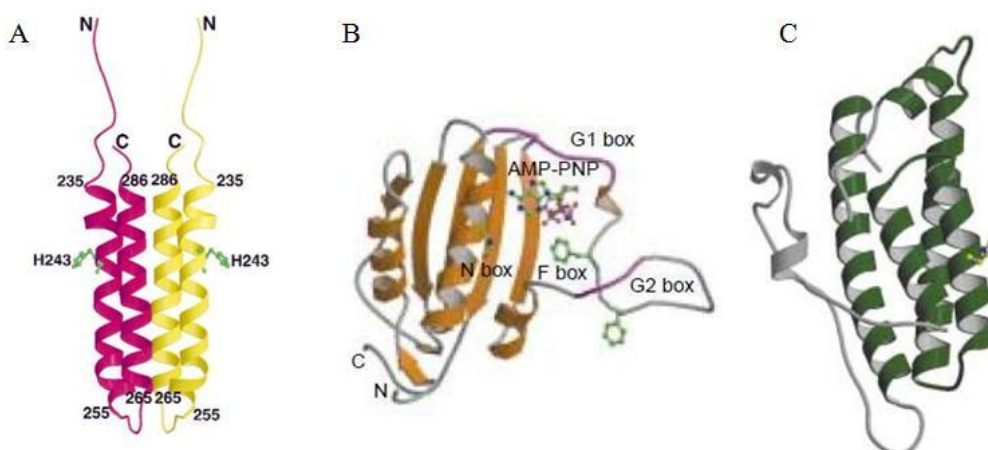
b) His-asp-his-asp fosfátový přenos začíná stimulací hybridní HK (obsahuje navíc regulační doménu s konzervovaným aspartátovým zbytkem). Fosfát z DHp domény je přenesen na aspartátový zbytek regulační domény, dále na konzervovaný histidinový zbytek fosfotrasferového proteinu obsahující histidin (Hpt protein) a poté na aspartátový zbytek regulační domény RR proteinu.

1.1.1 Struktura a funkce dvousložkových signálních systémů

Aby bylo možné prozkoumat, a následně porozumět mechanismu jakým dvousložkové signální systémy pracují, je nezbytně nutné nejprve znát strukturu HK a RR proteinu [8].

1.1.1.1 Histidinkinasa

HK je schopna zachytit extracelulární signál, vázat ATP a autofosforylovat histidinový zbytek [12]. Protože existuje obrovské množství podnětů, na které buňky různých organismů reagují, je logické, že existuje také velké množství dvousložkových signálních systémů (bylo popsáno více než 21 000 aminokyselinových sekvencí [14]). Intenzivním porovnáváním nalezených aminokyselinových sekvencí byly objeveny konzervované úseky/domény, a to hlavně u HK [9]. Všechny HK (jak prokaryotické, tak eukaryotické) mají variabilní sensorovou doménu a vysoce konzervované katalytické jádro [14]. Katalytické jádro je tvořeno dvěma velmi dobře rozlišitelnými doménami: ATP-vázající katalytickou doménou (CA z angl. „catalytic ATP-binding domain“) a dimerizační a histidin fosfotransferovou doménou (DHp z angl. „dimerization and histidine phosphotransfer domain“) [19]. DHp doména nese fosforylovatelný histidinový zbytek (H box) a zprostředkovává dimerizaci HK, CA doména váže ATP. Získáním a srovnáním krystalových struktur DHp domén EnvZ [20], DesK [21] a HK853 [22] bylo zjištěno, že DHp doména je tvořena helikální „hairpin“ (helixy $\alpha 1$ a $\alpha 2$), která je spojena s druhou helikální smyčkou a vytváří tak dimer tvořený svazkem čtyř helixů [14]. Helixy $\alpha 1$ a $\alpha 2$ jednotlivých monomerů jsou spojeny strukturně a velikostně variabilní smyčkou (DHp smyčka). $\alpha 1$ helixy jednotlivých monomerů obsahují konzervovaný H box, tedy místo, kde dochází k autofosforylaci histidinového zbytku. Tyto helixy jsou zároveň spojeny se sensorovou doménou. Struktura DHp domény je zobrazena na obrázku 2A, strana 18. CA doména je tvořena 5 antiparalelními β listy, třemi α šroubovicemi a strukturně vysoce flexibilním úsekem, který obsahuje primárně konzervované motivy označované jako N, G1, F, G2 boxy [23]. N box obsahuje asparaginový zbytek, který koordinuje hořčičný kationt, nezbytný pro katalýzu fosforylace. D box je specifickým místem pro vazbu ATP – aspartátový zbytek interaguje s N6 atomem adeninu [13]. G boxy slouží k „překrytí“ vázaného nukleotidu [14]. Struktura CA domény je zobrazena na obrázku 2B, strana 18.



Obrázek 2: Struktura DHP domény (A), CA domény (B) proteinu EnvZ a Hpt domény proteinu YPD1 (C); převzato z [20], [13], [13]

A) Dva monomery (fialová a žlutá barva) tvoří čtyř helixový svazek. Je zde vyznačeno také místo fosforylace jednotlivých α 1 helixů (H243).

B) CA doména v přítomnosti nehydrolyzovatelného analogu AMP-PNP. Toto místo je obklopeno konzervovanými motivy (G1, G2, N, F box)

C) Konzervovaný strukturní prvek Hpt domény – svazek čtyř α helixů. Je zde vyznačen i histidinový zbytek, který se účastní přenosu fosfátové skupiny.

pozn.: DHP – dimerizační a fosfotrasferová doména, CA – ATP-vázající katalytická doména, Hpt – fosfotrasferový protein obsahující histidin

Hpt domény jsou zastoupeny v minoritním množství dvousložkových signálních systémů [11]. U prokaryotních organismů jsou téměř výhradně součástí hybridních HK, u eukaryotních organismů se vyskytují jako samostatné proteiny [24]. Jsou známy struktury několika Hpt domén (popř. proteinů). Mezi ně náleží P1 doména CheA proteinu bakterie *Escherichia coli* [25], Hpt doména ArcB proteinu bakterie *Escherichia coli* [26], Spo0B protein bakterie *Bacillus subtilis* [27] a YPD1 protein kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* [28]. Bez ohledu na jejich naprosto rozdílné aminokyselinové sekvence, všechny tyto Hpt obsahují shodný strukturní prvek, a to svazek čtyř α helixů [11]. Tento strukturní prvek je zobrazen na obrázku 2C. Každý z uvedených proteinů má, kromě shodného strukturního motivu, další specifické strukturní elementy [13]. Ty pravděpodobně udělují proteinu vlastnosti pro správný intermolekulární kontakt [11]. Histidinový zbytek, který se účastní přenosu fosfátového zbytku, vyčnívá ze čtyř helixového svazku na povrch [13]. V okolí tohoto histidinového zbytku se nacházejí konzervované sekvence aminokyselin.

HK jsou rozdělovány do dvou skupin – ortodoxní a hybridní [23, 29]. Většina ortodoxních HK slouží jako periplasmatické membránové receptory. Typickým zástupcem

této skupiny je osmotický senzor bakterie *Escherichia coli* EnvZ protein [30]. Sensorová doména HK tohoto dimerního proteinu je umístěna v extracelulárním prostoru, katalytické jádro (DHP doména a CA doména) se nachází v cytosolu. Sensorová doména a katalytické jádro jsou propojeny pomocí dvou transmembránových helixů [11]. Existují také ortodoxní HK, které mají vyšší počet transmembránových helixů. Mezi tyto patří například FixL (protein podílející se na regulaci fixace dusíku bakterie *Rhizobium meliloti* [31]) se čtyřmi transmembránovými helixy [32], UhpB (protein, který je součástí transportu cukrů bakterie *Escherichia coli* [33]) s osmi transmembránovými helixy [34]. Ne všechny ortodoxní HK jsou ale vázány k membráně. Příkladem je rozpustný cytosolární protein CheA (podílí se na regulaci rotačního směru motoru bičíku [35]). Rozpustné HK mohou být ovlivňovány vnitrobuněčnými podněty a/nebo interagovat s cytoplasmatickými doménami ostatních proteinů [11].

Struktury hybridních HK jsou více komplikované než struktury ortodoxních HK (obrázek 1, strana 16). Vyskytují se v několika prokaryontních organismech, ale nalezneme je především u eukaryotních organismů [11]. HK řadí se do této skupiny, mají více fosfodonorových a fosfoakceptorových míst. Na rozdíl od ortodoxních HK, které využívají pouze jeden přenos fosfátové skupiny, hybridní HK používají více krokové na sebe navazující fosfátové přenosy (obrázek 1B, strana 16). Tyto komplexnější systémy poskytují více všestrannosti v signálních strategiích a mají více potenciálních míst pro regulaci [13]. ArcB (protein podílející se na regulaci exprese v závislosti na přítomnosti kyslíku u *Escherichia coli* [36]) představuje typického zástupce hybridních HK [11]. Je tvořen dvěma transmembránovými sensorovými doménami, katalytickým jádrem, doménou, která obsahuje aspartátový zbytek a Hpt doménou.

1.1.1.1 RR protein

RR protein katalyzuje přenos fosfátové skupiny z fosforylovaného histidinového zbytku HK na aspartátový zbytek RR proteinu. Tvrzení, že RR protein katalyzuje svoji vlastní fosforylaci, bylo podpořeno experimenty s donory fosfátové skupiny, odlišnými od HK [37]. Zdrojem fosfoskupiny může tedy být nejen fosforylovaná forma HK, ale fosfátovou skupinu mohou RR proteiny získat také od rozmanitých molekul, tzv. nízkomolekulárních donorů fosfátu. Například RR proteiny CheY [37], NRI [38], BvgA [39], OmpR [40], jsou fosforylovány a tím aktivovány prostřednictvím acetylfosfátu. Ukázalo se, že zatímco některé RR proteiny mohou jako nízkomolekulární donory

fosfátové skupiny využít hned několik látek (NRI je fosforylován acetylfosfátem, karbamoylfosfátem, fosforamidátem), jiné RR proteiny jsou fosforylovány v přítomnosti pouze jednoho nízkomolekulárního donoru fosfátu (CheB je fosforylován pouze fosforamidátem). Rozdílná je také míra fosforylace jednotlivých RR proteinů, např. v přítomnosti fosforamidátu je CheY fosforylován rychleji než NRI a ten je fosforylován rychleji než PhoB [41]. RR proteiny, které jsou fosforylovány nízkomolekulárními donory fosfátu, způsobují stejný efekt, jako ty RR proteiny, které byly fosforylovány standardním způsobem (tedy příslušnými HK) [38], např. CheB fosforylovaný za přítomnosti fosforamidátu má methylesterasovou aktivitu stejně tak jako CheB, který získal fosfoskupinu z fosforylované HK CheA [37, 38]. NRI nebyl fosforylován prostřednictvím fosfoenolpyruvátu [38]. Tato zřejmá substrátová specifita a aktivace mnoha RR proteinů prostřednictvím donorů fosfátové skupiny posloužila jako důkaz toho, že RR proteiny katalyzují svoji fosforylaci a jako substrát mohou využít různé donory fosfátových skupin [42]. Pokud je jako substrát pro fosforylaci použit nízkomolekulární donor fosfátu, dochází k mnohem méně efektivní fosforylaci ve srovnání s mírou fosforylace, kdy je substrátem příslušná fosfoforma HK (P-HK). Tento fakt byl prokázán na RR proteinech Spo0F a CheY. Spo0F (RR protein, podílející se na sporulaci *Bacillus subtilis* [4]), může jako substrát pro fosforylaci kromě P-HK KinA, využít také nízkomolekulární donory fosfátu (fosforamidát, histidinfosfát, pyridinfosfát, pikolinfosfát) [42]. Během studií fosforylace toho RR proteinu bylo zjištěno, že pokud byl jako substrát pro fosforylaci použit fosforamidát, fosforylační reakce byla méně efektivní, než tomu bylo při použití fosfoformy KinA. Z porovnání hodnot Michaelisových konstant (K_m pro reakci s fosforamidátem byla o tři řády vyšší než K_m pro reakci s KinA) vyplývá, že Spo0F má nízkou afinitu k fosforamidátu [42]. Reakce s KinA byla osmnáctkrát rychlejší, než reakce s fosforamidátem. CheY (RR protein, který reguluje pohyb bičíku bakterií *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*) může jako substrát pro fosforylaci využít kromě P-HK CheA také nízkomolekulární donory fosfátu (acetylfosfát, karbamoylfosfát, benzoylfosfát, fosforamidát). Také tento RR protein má mnohem vyšší afinitu k příslušné P-HK než k nízkomolekulárním donorům fosfátu a k fosforylaci za přítomnosti P-HK dochází mnohem rychleji, než v přítomnosti nízkomolekulárních donorů fosfátu [43]. Tato pozorování vedla k závěru, že P-HK významně podporuje katalýzu fosforylační reakce, protože tato forma je optimálním substrátem dané fosforylační reakce. To, proč je P-HK tak optimální substrát dané reakce a tím usnadňuje katalýzu, není zatím zcela jasné. Byly

však navrženy určité možnosti: P-HK vyvolá konformační změny RR proteinu, díky nimž je usnadněna vazba fosfátové skupiny, nebo svou vazbou stabilizuje přechodný stav daného procesu [42, 43].

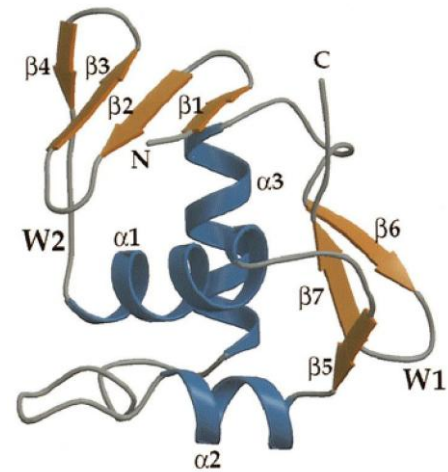
Většina RR proteinů obsahuje dvě rozlišitelné domény: konzervovanou regulační doménu a variabilní efektorovou doménu. Regulační doména kromě interakce s P-HK a přenosu fosfátové skupiny na svůj aspartátový zbytek také katalyzuje svoji vlastní defosforylaci. Většina ze známých RR proteinů jsou transkripční faktory, jejichž efektorová doména zprostředkovává vazbu s DNA [44]. Existují ale také RR proteiny, které mají enzymovou aktivitu a jejichž efektorová doména je tak enzymem. Příkladem takového RR proteinu je methylesterasa CheB bakterií *Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium*, ovlivňující chemotaxi [45].

V závislosti na koncentraci chemických látek v okolí bakterie, dochází prostřednictvím methylesterasové aktivity CheB [46] k demetylacii glutamátových zbytků, což vede ke změnám pohybu bakterie [47]. Na základě srovnání struktury CheY (průkopnický objev struktury tohoto RR proteinu byl uskutečněn před více než dvaceti lety [48]) s ostatními známými strukturami regulačních domén jiných proteinů [49], byla nalezena stejná α/β struktura. Regulační doména je tvořena pěti paralelními β listy, které jsou obklopeny pěti α helixy [11]. Fosforylačním místem velmi intenzivně studovaného RR proteinu CheY je Asp57 [50], v jehož těsné blízkosti se nachází Asp12 a Asp13, Thr87, Tyr 106 a Lys109 [13]. Bylo zjištěno, že jak pro fosforylaci, tak pro defosforylaci CheY je vyžadována přítomnost hořečnatého kationtu [51]. Na koordinaci hořečnatého kationtu se podílí kyslík z karboxylových postranních řetězců Asp13 a Asp57, kyslík z karbonylového řetězce Asn59 a tři molekuly vody, které vytváří vodíkové vazby s postranními řetězci aminokyselin [52]. Během přenosu fosfátové skupiny na Asp57 pak pravděpodobně dochází prostřednictvím hořečnatého kationtu ke vzniku pětimocného fosforového intermediátu. Fosfátová skupina pro fosforylaci CheY je přenášena z fosforylované formy HK CheA, která katalyzuje přenos fosfátové skupiny z ATP na svůj histidinový zbytek (tj. má autokinasovou aktivitu) [53].

Efektorové domény jsou velmi rozmanité a to nejen ve svých strukturách, ale také ve funkcích, které zajišťují. Většina ze známých RR proteinů jsou transkripční faktory a jejich efektorové domény tak zprostředkovávají vazbu k DNA, čímž ovlivňují transkripci příslušných genů. Takovéto efektorové domény mohou být rozděleny do tří hlavních podskupin na základě shodnosti jejich domén, které vážou DNA – i) OmpR/PhoB

„winged-helix“ doména, ii) NarL/FixJ čtyř-helixová doména a iii) NtrC transkripční faktory spřažené s ATPasou.

OmpR, velmi dobře charakterizovaný zástupce největší podskupiny, může být jak aktivátorem, tak represorem a reguluje tak expresi *ompC* a *ompF* genů na základě osmolarity okolí. Tyto geny kódují dva hlavní porinové proteiny vnější membrány K-12 bakterie *Escherichia coli* [54]. Při nízkých hodnotách osmolarity HK EnvZ (transmembránový senzor, který detekuje hladinu osmoticky aktivních látek [55]) zajišťuje velmi nízkou koncentraci fosforylovaného OmpR, čímž je umožněna exprese genu *ompF* [56]. Při vysokých hodnotách osmolarity je OmpR naopak velmi intenzivně fosforylován, což způsobí represi genu *ompF* a aktivaci genu *ompC* [57]. Pomocí X-paprskové analýzy krystalové struktury domény,



Obrázek 3: Struktura OmpR; převzato z [59]

Rozpoznávací helix interagující s velkým žlábkem DNA je označen α_3 , „křídla“ interagující s malým žlábkem DNA jsou označena W1, W2

kteřá váže DNA proteinu OmpR, byla definována nová „winged-helix“ podtřída transkripčních faktorů [58]. Tato struktura, která je přítomna u všech členů této podskupiny, obsahuje tzv. rozpoznávací helix, který interaguje s velkým žlábkem DNA a doprovodné smyčky („křídla“) interagující s menším žlábkem DNA (obrázek 3) [59].

Druhou podskupinu reprezentuje protein NarL. Tento transkripční faktor aktivuje/inaktivuje geny, které se podílí na metabolismu dusičnanů bakterie *Escherichia coli* [60]. Efektorová doména tohoto proteinu je tvořena čtyřmi helixy (prostřední dva tvoří „helix-turn-helix“ motiv) a obsahuje 62 aminokyselinových zbytků [61].

Strukturně a funkčně nejsložitější efektorovou doménu má třetí podskupina, jejímž zástupcem je protein NtrC (NRI). NtrC protein se podílí na expresi genů, jejichž produkty umožňují bakteriím přežít v situacích, kdy mají k dispozici omezené množství dusíku [38]. Fosforylovaná forma NtrC po vazbě na tzv. „enhancer“ katalyzuje izomeraci komplexu *glnA* promotor - σ^{54} -holoenzym (σ^{54} faktor asociovaný s jádrem RNA polymerasy), následně dochází k lokálnímu rozvolnění té části DNA, kde se nachází počáteční místo transkripce [62]. Efektorová doména RR proteinů této podskupiny je složena ze dvou částí: ATPasové části a části, která je zodpovědná za vazbu DNA [63]. Pokud je NtrC

fosforylován, dochází k jeho oligomerizaci, která stimuluje hydrolýzu ATP. Energie z hydrolýzy ATP je nutná pro izomerační reakci a následné zahájení transkripce [64].

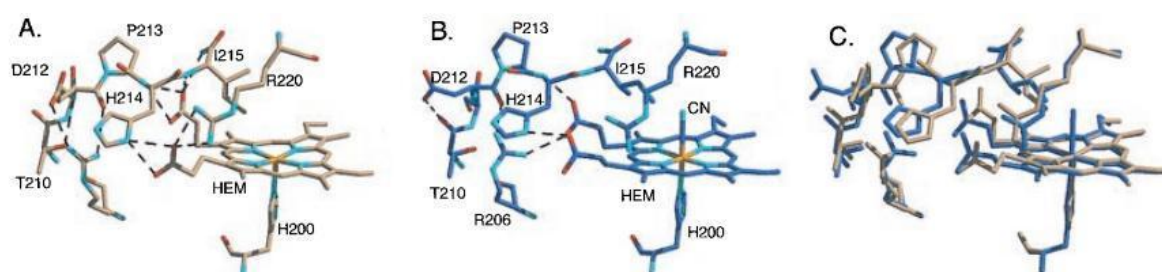
Ačkoliv existuje velká strukturní rozmanitost v efektorových doménách, regulační doména se vyskytuje pouze v jedné, vysoce strukturně konzervované α/β konformaci. Byla tedy provedena řada biochemických studií, které pomohly objasnit mechanismus regulace variabilní efektorové domény konzervovanou regulační doménou [13]. Předpokládá se, že regulační doména existuje v rovnováze mezi dvěma konformačními stavy – aktivním a neaktivním. Fosforylace regulační domény urychluje ustavení rovnováhy směrem k aktivní formě. Existuje několik různých mechanismů k aktivaci RR proteinů. Fosforylace regulační domény může podpořit dimerizaci fosforylovaných RR proteinů [65], oligomerizaci fosforylovaných RR proteinů [66], interakci s dalšími proteiny [67] nebo DNA [54]. Fosforylace regulační domény však může vést také k inaktivaci RR proteinu, jako je tomu např. u proteinu SSK1 [68].

Dvousložkové signální systémy v bakteriálních buňkách plní nezastupitelné a extrémně důležité funkce a zároveň nebyly identifikovány u člověka [13]. Nalezení inhibitorů selektivních výhradně k příslušným HK a RR proteinům by tak mohlo přinést vývoj nových antimikrobiálních léčiv [69]. Dvousložkové signální systémy byly proto v průběhu posledních několika desetiletí velmi intenzivně studovány. Bylo tak objeveno velké množství HK a RR proteinů. U mnohých z nich se podařilo objasnit, jakou funkci v daném organismu vykonávají, a u některých byla také určena jejich struktura. Objevené HK lze dělit do skupin na základě jejich struktury, funkce, mechanismu účinku a mnohých dalších kritérií [1]. V následující kapitole budou detailněji popsány vybrané HK (FixL, DosT, DosS, AfGcHK), jejichž společnou vlastností je schopnost reverzibilně vázat molekuly plynů (kyslík, oxid uhelnatý, oxid dusnatý) z okolí daného organismu a tímto způsobem je detekovat. Tyto HK jsou řazeny do skupiny tzv. proteinů detekujících plyn.

1.2 Proteiny detekující plyn

Tyto proteiny byly nalezeny převážně u bakterií a skládají se z minimálně dvou domén – sensorové a funkční. Zatímco pro některé bakterie je přítomnost určitého plynu (především kyslíku) v jejich okolí neslučitelná se životem, jiné bakterie tento plyn pro své přežití vyžadují. Během fylogeneze tak došlo k vývoji proteinů, které jsou schopny koncentraci daného plynu detekovat a na základě jeho přítomnosti nebo nepřítomnosti ovlivňovat mnohé fyziologické procesy [70]. Molekula plynu interaguje s prostetickou

skupinou proteinu, kterou je v tomto případě molekula hemu, resp. iont železa inkorporovaný v protoporfyrinové struktuře hemu. Hem je vždy lokalizován v sensorové doméně. Interakce hemu s molekulou plynu, ať již ve smyslu koordinace nebo disociace, vyvolá konformační změnu sensorové domény. Molekulární mechanismus tohoto procesu je znázorněn na obrázku 4 na konkrétním příkladě proteinu FixL, izolovaném z bakterie *Bradyrhizobium japonicum* (*BjFixL*). Následují další strukturní změny proteinu, které způsobí aktivaci/inaktivaci funkční domény [71]. Funkční domény mají nejčastěji transkripční aktivitu [72], fosfodiesterasovou aktivitu [73], guanylátcyklasovou aktivitu [74] nebo histidinkinasovou aktivitu [75]. Mezi detekovatelné molekuly plynu patří kyslík, oxid uhelnatý a případně také oxid dusnatý [71].



Obrázek 4: Porovnání struktur částí sensorových domén *BjFixL* před (A) a po (B) vazbě ligandu k hemu; převzato z [76]

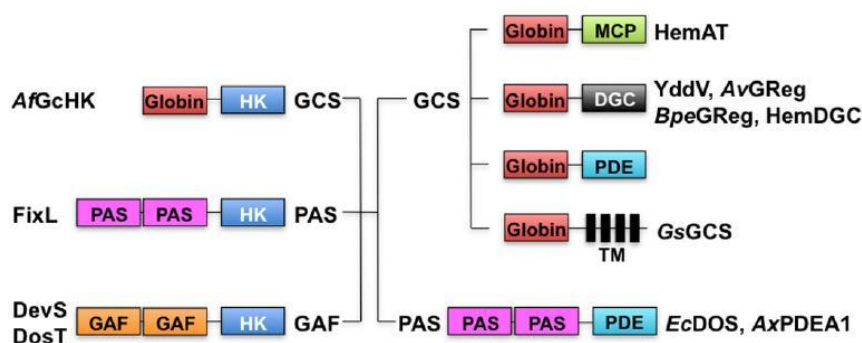
A) Pokud není k hemu vázán ligand, vytváří Arg220 vodíkový můstek s hemovým propionátem 7

B) Po vazbě ligandu (v případě tohoto experimentu byl jako ligand místo kyslíku použit kyanidový aniont) k molekule hemu dochází k posunu propionátu 7 a k přerušení vazby propionátu 7 s Arg220, Arg 206 vytváří vodíkový můstek s hemovým propionátem 6. Tyto změny vedou k posunu FG smyčky (Ser209-Arg220), což vyvolá další strukturní změny proteinu, které vedou k ovlivnění kinasové aktivity.

C) Ke zvýraznění strukturních změn obou forem je zde znázorněn jejich překryv

1.2.1 Proteiny detekují kyslík

Senzorové domény proteinů, které detekují kyslík, se vyskytují v zásadě ve třech různých prostorových uspořádáních [71]. Jedná se o tzv. PAS, GAF a globinovou strukturu sensorové domény. Funkční doména proteinů detekujících kyslík může vykazovat transkripční aktivitu, fosfodiesterasovou aktivitu, diguanylátcyklasovou aktivitu, histidinkinasovou aktivitu (viz předchozí odstavec). Dochází tak ke vzájemným kombinacím různých strukturních motivů sensorových a funkčních domén. Některé z těchto kombinací jsou znázorněny na obrázku 5, strana 25.



Obrázek 5: Kombinace senzorových a funkčních domén u proteinů detekujících kyslík; převzato z [77]

Nalevo jsou zobrazeny proteiny detekující kyslík, které mají histidinkinasovou aktivitu (HK modrý rámeček). Mezi tyto proteiny patří AfGcHK s globinovou strukturou senzorové domény (GCS), FixL s PAS strukturou senzorové domény (fialový rámeček) a proteinů DevS a DosT s GAF strukturou senzorové domény (hnědý rámeček).

Napravo jsou zobrazeny proteiny detekující kyslík, které mají jinou, než histidinkinasovou aktivitu. Jedná se o diguanylátcyklasovou aktivitu (DGC černý rámeček) proteinů YddV, AvGReg, BpeGReg, HemDGC s globinovou strukturou senzorové domény, fosfodiesterasovou aktivitu (PDE tyrkysový rámeček) proteinů EcDOS, AxPDEA1 s PAS strukturou senzorové domény. Katalytická doména proteinu HemAT je tvořena chemotaktickým proteinem přijímajícím metyl (MCP zelený rámeček). U proteinu GcGCS nebyla zcela objasněna aktivita jeho katalytické domény.

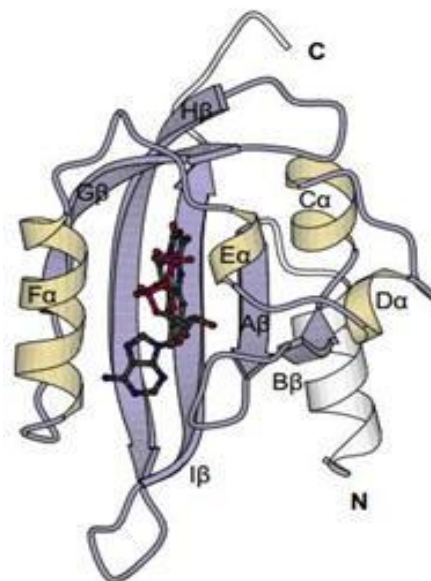
pozn.: PAS, GAF - strukturní motivy prostorového uspořádání proteinů

1.2.1.1 PAS doména

PAS je akronym, odvozený z anglických názvů proteinů, ve kterých byl tento strukturní motiv nalezen. Jedná se o tyto proteiny: „*Drosophila* period clock protein“, „vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ a „*Drosophila* single minded protein“ [78]. Proteiny, které obsahují PAS doménu, se vyskytují napříč všemi živými organismy, jako jsou archea, eubacteria a eukarya [79]. Tento strukturní motiv se podílí na monitorování změny ve vstupním signálu. Těmito signály jsou např. světlo [80], redoxní potenciál [81] nebo molekula kyslíku [82].

Navzdory obrovské funkční rozmanitosti mají PAS domény konzervovanou α/β strukturu [83]. První krystalová struktura PAS domény byla určena u PYP, fotoreceptoru, který se podílí na fototaxi bakterie *Halorhodospira halophila* [80]. Byly nalezeny desítky proteinů, které obsahovaly téměř stejnou strukturu, ačkoliv jejich sekvence aminokyselin byly jen málo homologní.

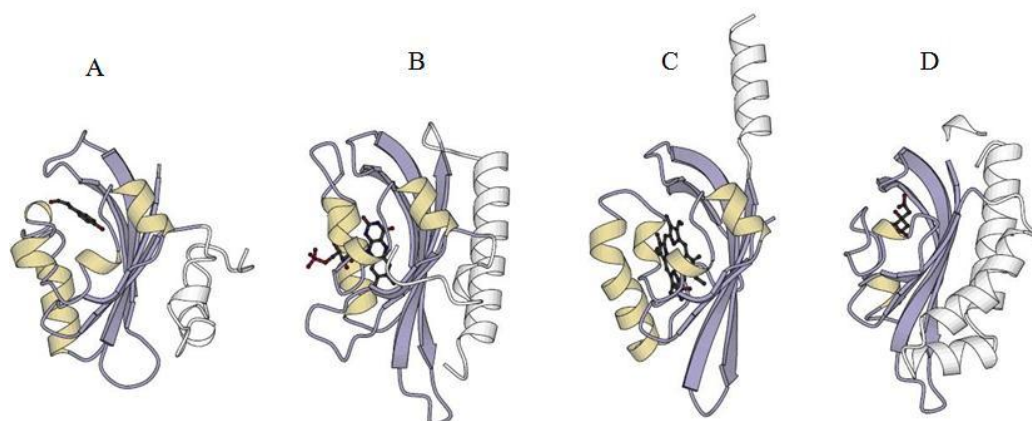
Na základě těchto porovnání pak byla definována struktura PAS domény. Jak je znázorněno na obrázku 6, běžná PAS doména je tvořena pěti-vláknovým antiparalelním β listem ($A\beta$, $B\beta$, $G\beta$, $H\beta$, $I\beta$), který je doprovázen několika α helixy ($C\alpha$, $D\alpha$, $E\alpha$, $F\alpha$) [84]. Struktura centrálního β listu je u všech porovnávaných proteinů vysoce konzervovaná. Na rozdíl od β struktury, orientace, délka i počet α helixů se u PAS domén jednotlivých proteinů značně liší [84]. Pro názornost jsou na obrázku 7, strana 27 uvedeny struktury čtyř konkrétních PAS domén různých proteinů, konzervované α helixy jsou vyobrazeny žlutě, variabilní α helixy jsou vyobrazeny bíle.



Obrázek 6: Struktura PAS domény proteinu NifL; převzato z [85]

Doprovodný, nekonzervovaný α helix je označen bílou barvou. pozn. PAS - strukturní motiv prostorového uspořádání proteinu

Mnohé PAS domény váží určité kofaktory, a to jak kovalentně, tak nekovalentně. U některých PAS domén je vazba příslušného kofaktoru signálem, který způsobí buněčnou odpověď. Tak je tomu např. u proteinu CitA bakterie *Klebsiella pneumoniae*, který váže molekulu citrátu (obrázek 7D, strana 27) a tím prostřednictvím funkční domény a následné interakce s RR proteinem CitB ovlivňuje růst bakterie [85]. U ostatních PAS domén je kofaktor vazebným místem pro detekovanou molekulu. Jak již bylo uvedeno výše, je typickým kofaktorem pro detekci plynů molekula hemu [71]. Zástupcem proteinů detekujících kyslík s PAS doménou je protein FixL (obrázek 7C, strana 27) [82]. Vybrané příklady kofaktorů PAS domén jsou uvedeny v tabulce 1, strana 27.



Obrázek 7: Rozmanitost struktur PAS domén; převzato z [84]

A) Struktura PAS domény PYP *Halorhodospira halophila*

B) Struktura PAS domény fototropinu 1 *Avena sativa*

C) Struktura PAS domény FixL *Bradyrhizobium japonicum*

D) Struktura PAS domény CitA *Klebsiella pneumoniae*

Všechny tyto struktury mají shodný centrální β list a odlišné orientace, délky a počty doprovodných α helixů (tyto α helixy jsou označeny bílou barvou)

pozn. PAS - strukturní motiv prostorového uspořádání proteinu

Tabulka 1: Příklady kofaktorů PAS domén vybraných proteinů; upraveno dle [84]

V tabulce jsou uvedeni vybraní zástupci proteinů s PAS doménou a jejich příslušné kofaktory. Protein detekující kyslík s PAS doménou je protein FixL., pozn. FMN: flavinmononukleotid, FAD: flavinadenindinukleotid

protein	organismus	kofaktor	literární zdroj
PYP	<i>Halorhodospira halophila</i>	kys. kumarová	[80]
fototropin1	<i>Avena sativa</i>	FMN	[86]
YtvA	<i>Bacillus subtilis</i>	FMN	[87]
NifL	<i>Azotobacter vinelandii</i>	FAD	[88]
FixL	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	hem	[82]
CitA	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	citrát	[85]
PhoQ	<i>Escherichia coli</i>	iont kovu	[89]

Až doposud byly vlastnosti PAS domény popisovány obecně na příkladech různých proteinů, z nichž většina nepatří do kategorie proteinů detekujících kyslík. Následující text pojednává o konkrétním proteinu detekující kyslík s PAS doménou, a to o FixL.

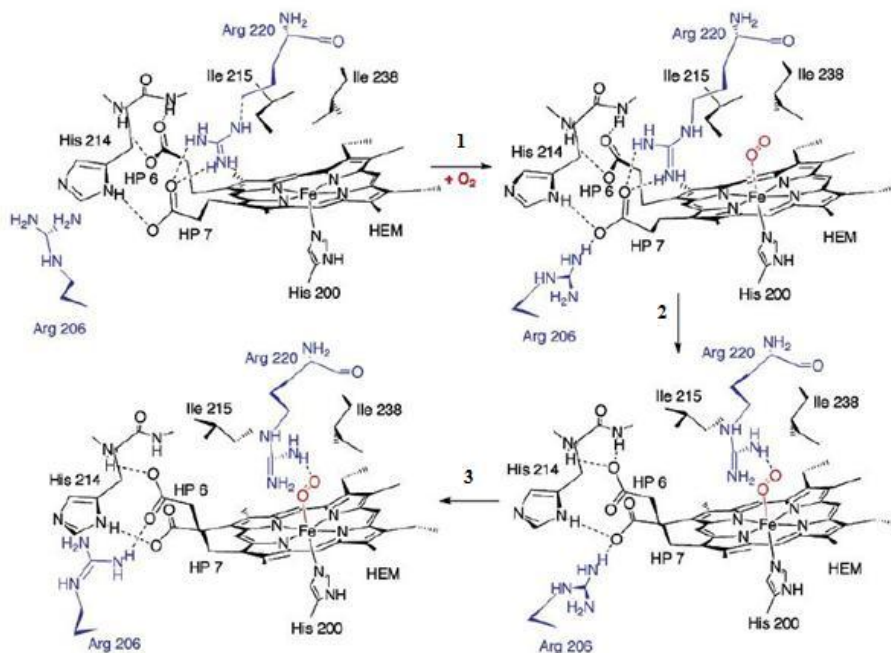
FixL byl prvním proteinem, který byl identifikován jako enzym detekující plyn [75]. Tento protein je součástí dvousložkového signálního systému (FixL/FixJ), který má

za úkol, v závislosti na přítomnosti kyslíku, regulovat fixaci dusíku bakterie *Sinorhizobium meliloti* (dříve nazývané *Rhizobium meliloti*) [75].

Fixace dusíku je složitý proces, který vyžaduje vysoký přísun energie a nízkou hladinu kyslíku [90]. Na redukci jedné molekuly dusíku je využito až 28 molekul ATP, anaerobní podmínky jsou nezbytné pro enzymovou aktivitu nitrogenasy [31]. Obligátně aerobní bakterie *Sinorhizobium meliloti* žije v symbiotickém vztahu s rostlinami čeledě bobovitých (*Fabaceae*). V hlízce těchto bobovitých rostlin je syntetizován protein leghemoglobin, který má velmi vysokou afinitu k molekule kyslíku [31]. Tím je zajištěno prostředí s nízkými hladinami kyslíku pro ochranu nitrogenasy. Zároveň bobovité rostliny poskytují bakterii přísun energie pro redukci dusíku. Vzhledem k tomu, že se jedná o energeticky velmi náročný proces, je nutné při nesplnění podmínek pro správný průběh fixace dusíku tento proces zastavit. Děje se tak na úrovni exprese genů – pro fixaci dusíku bakterie využívá nejméně 23 genů (*nif* a *fix* geny) [91]. Transkripce těchto genů je indukována prostřednictvím dvousložkového signálního systému FixL/FixJ, a to pouze při nízké koncentraci kyslíku [91]. FixL je v tomto dvousložkovém signálním systému kyslíkovým senzorem s histidinkinasovou aktivitou, FixJ je transkripčním faktorem. Pokud se v okolí nenachází kyslík, dochází k autofosforylaci histidinového zbytku FixL, prostřednictvím γ -fosfátového zbytku ATP. Poté následuje přenos fosfátového zbytku na transkripční faktor FixJ, který je tímto aktivován a spustí kaskádu exprese genů zodpovědných za fixaci dusíku [91]. Vazba kyslíku k molekule hemu naopak způsobí inaktivaci kinasové aktivity a s tím spojenou inaktivaci transkripčního faktoru [76].

Na základě studia prostorových struktur sensorové domény proteinu FixL bez vázaného ligandu a s vázaným ligandem byl odhalen mechanismus tohoto procesu na molekulární úrovni. Tyto struktury byly určeny u proteinu FixL bakterie *Bradyrhizobium japonicum* (obrázek 8, strana 29) [82]. Při porovnání struktur hemových částí s vázaným ligandem a bez vázaného ligandu bylo zjištěno, že k nejvýraznějším odlišnostem dochází v úseku FG smyčky (Ser209 – Arg220). Po vazbě ligandu k iontu železa dochází ke „zploštění“ porfyrinového kruhu a tím k oddálení propionátu⁷. Toto oddálení způsobí zeslabení vazby Arg220 a propionátu⁷ a naopak dojde k vytvoření vazby mezi Arg206 a propionátem⁷. Arg220 vytvoří vazbu s vázaným ligandem. V posledním kroku dochází k posunu Arg206, který vytvoří vazbu s propionátem⁶. Tento mechanismus je znázorněn na obrázku 8, strana 29. Výsledkem všech těchto změn je posun FG smyčky dál od

porfyrinového kruhu. Tento posun vyvolá globální změnu v konformaci celého proteinu, která je příčinou inhibice kinasové aktivity [82].



Obrázek 8: Mechanismus konformační změny hemové části BjFixL; převzato z [82]

Po vazbě ligandu (molekula kyslíku) k hemu, dochází k posunu propionátu (HP7), tím je oslabena vazba HP7-Arg220. S HP7 následně vytváří vazbu Arg206 (1). Arg220 vytváří vodíkovou vazbu s vázaným kyslíkem (2). Posledním krokem tohoto mechanismu je změna vazby Arg206 k HP6 (3).

1.2.1.2 GAF doména

GAF domény tvoří jednu z největších a nejvíce rozšířených proteinových domén, které byly nalezeny u archeí, bakterií i eukaryí [92]. GAF je akronym, který byl odvozen z anglických názvů proteinů, ve kterých byla tato struktura poprvé identifikována. Těmito proteiny jsou: „cGMP - specific phosphodiesterases“, „*Anabaena* adenylyclases“ a „*E. coli* formate hydrogenlyase transcriptional activator“ [93]. Proteiny, ve kterých byly GAF domény nalezeny se podílí např. na regulaci genové exprese, fixaci dusíku nebo jsou detekčním místem ve dvousložkových signálních systémech [94].

Ačkoliv PAS a GAF domény mají naprosto odlišné aminokyselinové sekvence, bylo při porovnání třídimenzionálních struktur těchto domén nalezeno velké množství shodných prvků [95]. Stejně jako PAS domény, také GAF domény jsou uzpůsobeny pro vazbu kofaktorů, jejichž prostřednictvím detekují jejich koncentraci v okolí nebo se na tyto kofaktory váží detekované molekuly. Těmito kofaktory jsou např. flavin, adenin, guanin nebo hem [92]. Mezi proteiny, které mají GAF doménu s vázaným hemem, a jsou tedy

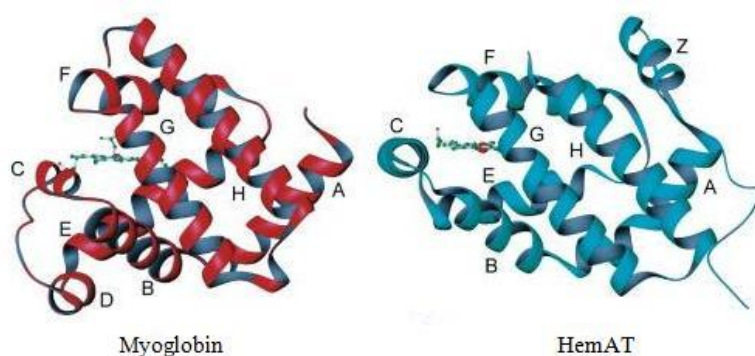
proteiny detekující plyny, patří histidinkinasy DosT a DosS bakterie *Mycobacterium tuberculosis*.

Mycobacterium tuberculosis je patogenní, obligátně aerobní bakterie, která dokáže přecházet z replikačně aktivní formy do neaktivních klidových stádií. V klidovém stádiu pak bakterie může v hostiteli přežít i několik desítek let, kdy je navíc vysoce rezistentní k působení léků [96]. Přejít z aktivní do neaktivní formy je vyvolán hypoxií nebo působením oxidu dusnatého a/nebo oxidu uhelnatého prostřednictvím exprese specifických genů (Dos regulon) [97]. Exprese těchto genů je vyvolána působením transkripčního faktoru DosR (DevR), který je spolu s histidinkinasy DosT a DosS (DevS) součástí dvousložkového signálního systému [98]. DosT a DosS, jsou strukturně podobné histidinkinasy, každá z nich obsahuje dvě na sebe navazující GAF domény [99]. První GAF doména obsahuje molekulu hemu, který váže kyslík nebo oxid uhelnatý nebo oxid dusnatý. V prostředí, kde je vysoká koncentrace kyslíku a zároveň nízká koncentrace oxidu uhelnatého a oxidu dusnatého je autofosforylační aktivita histidinkinasy DosT, DosS inhibována [99]. Na rozdíl od situace, kdy se bakterie vyskytuje v hypoxickém prostředí, popř. prostředí, kde je vysoká koncentrace oxidu dusnatého nebo oxidu uhelnatého. V tomto případě naopak dochází k velmi intenzivní autofosforylaci histidinkinasy, následovaná fosforylací transkripčního faktoru a expresí genů, které umožní bakterii přejít do klidového stadia [99].

1.2.1.3 Globinová doména

Prostorová struktura globinové domény je tvořena osmi α -helixy (označovanými A – H), které jsou spojeny krátkými segmenty [100]. V proteinech jako je hemoglobin nebo myoglobin je funkcí globinu prostřednictvím jeho kofaktoru hemu transportovat eventuálně skladovat kyslík. Globinová struktura byla však nalezena také u proteinů prokaryontních organismů, které zastávají odlišné funkce než hemoglobin nebo myoglobin [101]. Byl proveden bioinformatický průzkum 2275 bakteriálních a 140 archeálních genomů, který prokázal, že ve více než polovině bakteriálních a přibližně pětině studovaných archeálních genomů se vyskytují geny, které kódují proteiny s globinovou strukturou [102]. Tyto globiny bylo možné zařadit do jedné ze tří skupin: globiny myoglobinového typu, sensorové globiny a zkrácené (“truncated“) globiny. Globiny myoglobinového typu a sensorové globiny mají 3/3 α helikální strukturu, zatímco zkrácené globiny mají 2/2 α helikální globinovou strukturu [103]. Sensorové globiny zahrnují

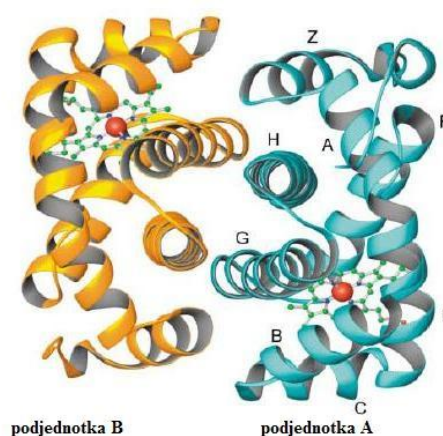
proteiny detekující kyslík s globinovou strukturou (jsou označovány zkratkou GCS z anglického názvu „globin-coupled oxygen sensor“), protoglobiny a sensorové jednodoménové globiny. Globin, který se vyskytuje v GCS se od globinu v hemoglobinu popř. myoglobinu (se kterými mají sensorové globiny stejný genetický původ) odlišuje chybějícím D-helixem a částí E-helixu (obrázek 9) [103].



Obrázek 9: Porovnání třídimenzionálních struktur globinů myoglobinu a HemAT; převzato z [104]

Globin HemAT izolovaný z bakterie Bacillus subtilis a globin myoglobinu izolovaný ze spermatu vorvaně se od sebe liší v helixech D, E, Z. pozn: HemAT – aerotaktický transduktor obsahující hem

Jedním z mála GCS, u kterých byla určena krystalová struktura sensorové domény je aerotaktický transduktor obsahující hem (HemAT) [104]. HemAT ovlivňuje směr pohybu archeonu *Halobacterium salinarum* (HemAT-Hs) a bakterie *Bacillus subtilis* (HemAT-Bs) v závislosti na koncentračním gradientu kyslíku [105]. Sensorová doména HemAT je ve formě krystalu homodimerem – styčná plocha mezi jednotlivými monomery je tvořena helixy G a H, které tvoří čtyřhelixový antiparalelní svazek, dále částí helixu Z a částmi helixů B a C (obrázek 10). Byla určena krystalová struktura bez vázaného ligandu [Fe (II) forma] a s vázaným ligandem [Fe



Obrázek 10: Krystalová struktura sensorové domény HemAT; převzato z [105]

pozn: HemAT - aerotaktický transduktor obsahující hem

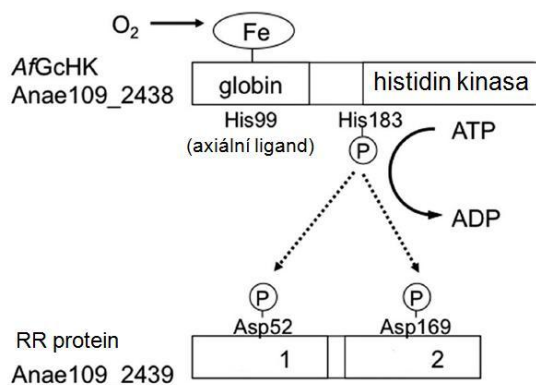
(III)-CN forma], která ukázala, že z jedné podjednotky dimeru [Fe (II) formy] vyčnívá na povrch proteinu hydroxylová skupina Tyr70 (lokalizovaného v helixu B na pozici 10 – B10). V případě [Fe (III)-CN formy] tento hydroxyl interaguje s vázaným kyanidovým

aniontem. Byl proveden experiment, kdy byl tento tyrosin nahrazen jinými aminokyselinami, a to fenylalaninem, leucinem nebo tryptofanem [106]. Všechny tyto mutace vedly k drastickým změnám v kinetických parametrech vazby kyslíku na senzorovou doménu HemAT. Na základě těchto poznatků bylo proto předpokládáno, že hydroxylová skupina Tyr70 (B10) stabilizuje vazbu kyslíku k hemu prostřednictvím vodíkových můstků [106]. Z výsledků získaných pomocí rezonanční Ramanovy spektroskopie, kdy byly měřeny spektrální změny HemAT před a po vazbě ligandu, však vyplynulo, že Tyr70 nevytváří s vázaným kyslíkem vodíkovou vazbu [107, 108]. Zdá se tedy, že role Tyr70 v HemAT není stále ještě uspokojivě vysvětlena. Dále bylo zjištěno, že po vazbě kyslíku k hemu (respektive iontu železa) dochází k vytvoření vodíkové vazby mezi propionátem6 a His86. Vytvoření této vodíkové vazby vyvolá konformační změny proteinu (zejména v pozici helixu E) jejichž následkem je posun Tyr95 do míst, kde může vytvořit vodíkovou vazbu s vázaným kyslíkem. Zároveň po vazbě kyslíku dochází k posunu helixu B a helixu G, což vede k přenosu signálu na funkční doménu [109].

Histidinkinasa s globinovou strukturou senzorové domény izolovaná z bakterie *Anaeromyxobacter sp.*, kmen Fw 109-5 (AfGcHK) je prvním nalezeným GCS, který má histidinkinasovou aktivitu [110]. Aktivita HK je výrazně podpořena vazbou kyslíku k hemu [Fe (II)-O₂]. K fosforylaci HK dochází také v případě, kdy je k hemu vázán oxid uhelnatý [Fe (II)-CO] nebo pokud je iont železa v oxidovaném stavu [Fe (III)]. Pro identifikaci autofosforylačního místa byly porovnány aminokyselinové sekvence AfGcHK s dalšími ortology histidinkinas s globinovou strukturou a FixL. Ve všech těchto sekvencích byl nalezen vysoce konzervovaný His183. Byla proto provedena mutace této aminokyseliny (H183A). [Fe (III)] a [Fe (II)-O₂] ztratily po provedení mutace svoji autofosforylační aktivitu, což jasně prokázalo, že His183 je autofosforylačním místem AfGcHK. Po autofosforylaci AfGcHK dochází k přenosu fosfátové skupiny na příslušný RR protein. Pro identifikaci fosforylačních míst RR proteinu byl proveden podobný postup jako u identifikace fosforylačního místa AfGcHK. RR protein má dvě fosforylační místa – Asp52 a Asp169. Mechanismus fosforylace AfGcHK je znázorněn na obrázku 11, strana 33. Axiálním ligandem hemu na proximální straně je His99, Tyr45 se zřejmě podílí na stabilizaci vázaného kyslíku pomocí vodíkových můstků.

Funkce RR proteinu v tomto dvousložkovém signálním systému zatím nebyla plně objasněna. Gen, který souvisí s tímto dvousložkovým signálním systémem, byl identifikován také u bakterií *Anaeromyxobacter dehalogenans* a *Myxococcus xanthus*

[110]. *Anaeromyxobacter* roste jak v aerobním, tak anaerobním prostředí, zatímco *Myxococcus* je obligátně aerobní a nedokáže proto přežít v anaerobních podmínkách. Z tohoto důvodu tento dvousložkový signální systém zřejmě reguluje specifické fyziologické funkce, které vyžadují optimální koncentraci kyslíku, jako je tvorba plodniček a sporulace [111].



Obrázek 11: Schéma mechanismu regulace RR proteinu prostřednictvím AfGcHK; převzato z [110]

Po vazbě kyslíku k iontu železa dochází k aktivaci histidinkinasy, která katalyzuje fosforylaci His183, prostřednictvím γ -fosfátového zbytku ATP. Následně dochází k přenosu fosfátu na RR protein, konkrétně na místa Asp52 a Asp169.

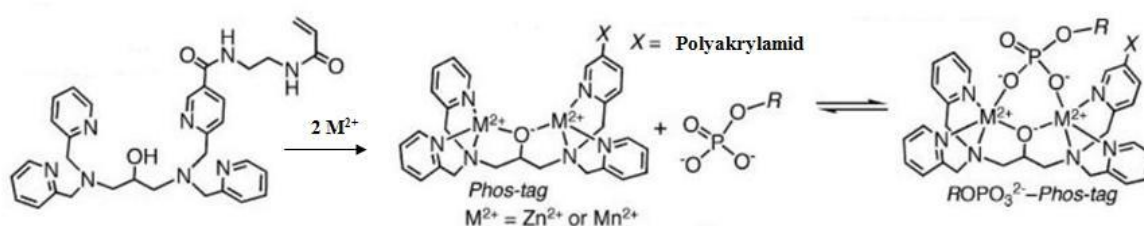
1.3 Metody používané pro detekci fosforylovaných forem HK a RR proteinu

Fosforylace proteinů zastává důležitou úlohu v celé řadě buněčných procesů [112]. Pro studium fosforylačních reakcí a následnou vizualizaci fosforylovaných forem proteinů byla proto vyvinuta celá řada metod. Mezi ně patří například (i) využití specifické protilátky proti fosforylované a nefosforylované formě substrátu, pokud je tento proteinové povahy [113], (ii) použití speciálně radioznačeného fosfátového zbytku [37] nebo (iii) použití specifického fosfát vázajícího činidla, známého pod komerčním názvem Phos-tag [110]. Phos-tag byl úspěšně využit ve spojení s metodami jakými jsou afinitní chromatografie [114], ionizace laserem za přítomnosti matrice s průletovým analyzátozem hmotnostní spektrometrie [115] a diskontinuální elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného [116]. V předkládané diplomové práci byla pro detekci fosforylace proteinu AfGcHK a jeho příslušného RR proteinu použita metoda

modifikované SDS elektroforesy s Phos-tagem, jejíž princip je detailněji popsán v následující kapitole.

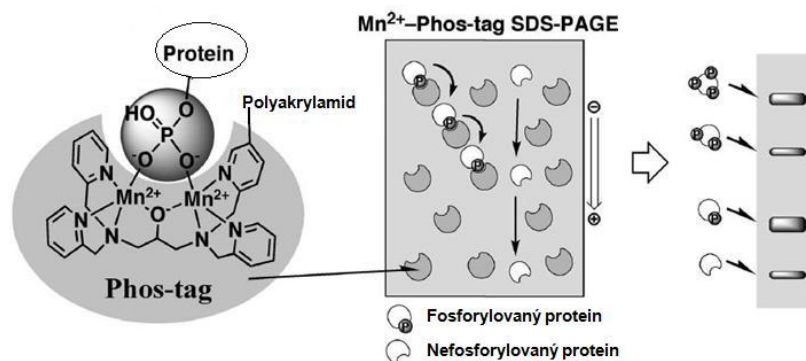
1.3.1 Diskontinuální elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného obsahující Phos-tag

Phos-tag je komerční název pro sloučeninu (1,3-bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]propan-2-olato), která v přítomnosti manganatých (eventuálně zinečnatých) kationtů vytváří specifickou nekovalentní vazbu s fosfátovými zbytky při neutrálním pH prostředí [117]. Bylo prokázáno, že Phos-tag selektivně interaguje s proteiny, které obsahují fosforylované aminokyseliny serin, threonin, tyrosin [116], histidin [118] a aspartát [117]. Princip této metody je následující. Phos-tag obsahuje dvě volná vazebná místa, ke kterým jsou koordinovány dva ionty kovu. Takto vytvořené vazebné místo je vhodné pro přístup fosfátového zbytku fosforylovaného proteinu (obrázek 12). Fosforylované proteiny, které vytvoří vazbu s komplexem Phos-tag – manganaté kationty putují separačním akrylamidovým gelem s nižší rychlostí, než totožné nefosforylované proteiny. Tím dojde k oddělení fosforylované formy proteinu od nefosforylované formy. Pomocí této metody lze rozdělit také fosforylované formy proteinu, které se od sebe liší počtem fosforylovaných míst – čím více fosforylovaných míst protein obsahuje, tím se gelem pohybuje pomaleji. Tento proces je zobrazen na obrázku 13, strana 35.



Obrázek 12: Tvorba komplexu Phos-tag - fosforylovaný protein; převzato z [116]

Phos-tag spolu s ionty kovu (M^{2+}) vytváří vazebné místo pro fosforylovaný protein (R-O-PO_3^{2-})



Obrázek 13: Separace fosforylované a nefosforylované formy proteinu pomocí Phos-tag SDS PAGE; upraveno dle [119]

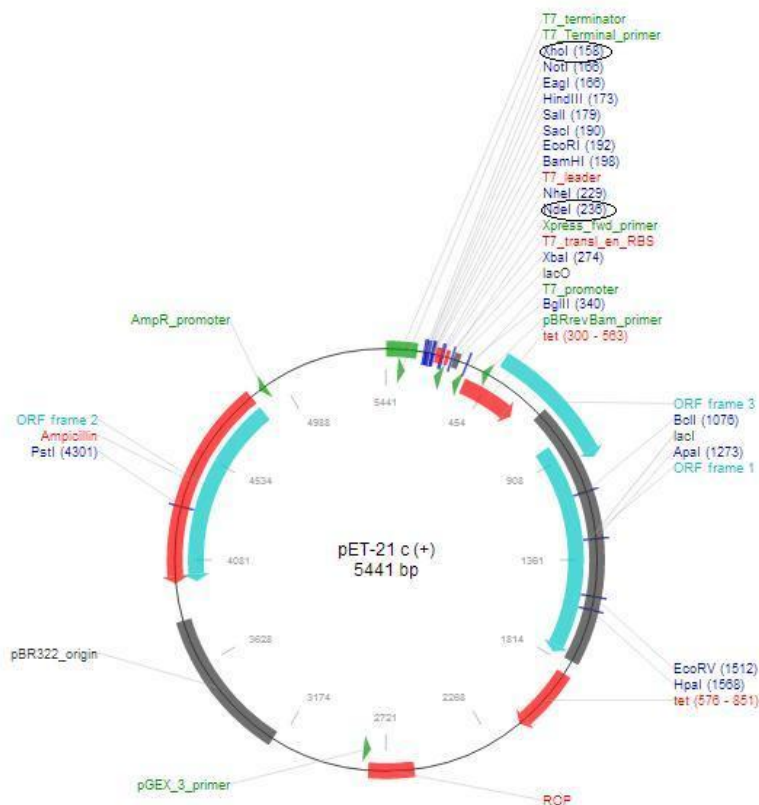
Phos-tag vytváří spolu s manganatými kationty komplex, který váže fosfátovou skupinu fosforylovaného proteinu. Takovýto navázaný protein se pohybuje separačním gelem s nižší rychlostí než nevázaný nefosforylovaný protein. Nefosforylovaná forma proteinu tak doputuje dále než fosforylovaná forma proteinu a na výsledném separačním gelu lze tyto formy rozlišit.

1.4 Plasmid pET-21c(+)

Pro expresi proteinu AfGcHK byl použit expresní vektor pET-21c(+). Na obrázku 14, strana 36 je znázorněna mapa tohoto plasmidu [120]. Expresní vektor pET-21c(+) obsahuje 5441 párů bazí. Plasmid pET-21c(+) obsahuje gen, zajišťující rezistenci k ampicilinu, což umožňuje selekci buněk transformovaných tímto plasmidem.

Tento plasmid obsahuje T7 promotor, který je specifický pouze pro T7 RNA polymerasu [121]. T7 RNA polymerasa je mnohonásobně výkonnější než vlastní RNA polymerasa bakterie *E. coli*. Gen (v případě experimentů prováděných v rámci této diplomové práce gen pro AfGcHK), který je umístěn za T7 promotorem, je tak exprimován velmi efektivně. Integrace genu pro T7 polymerasu do genomu *E. coli* je provedena pomocí bakteriofága DE3 [121]. K expresi proteinu AfGcHK byly použity buňky *E. coli* BL-21(DE3), obsahující tento gen. T7 promotor je umístěn v pozici 307-325 bp [122]. Gen pro T7 RNA polymerasu je pod kontrolou lac operonu, který je v nepřítomnosti induktoru (isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid - IPTG) blokován represorem (produkt genu lacI) [121]. Přídavkem IPTG dochází k aktivaci lac operonu a tím i k expresi T7 RNA polymerasy. T7 RNA polymerasa nasedne na T7 RNA promotor a přepisuje vnesený gen pro cílový protein.

Gen, který kóduje protein AfGcHK byl do plasmidu pET-21c(+) vložen pomocí restrikčních míst XhoI a NdeI (na obrázku 14 jsou tato restrikční místa označena černě). Na N-konci exprimovaného proteinu byla lokalizována sekvence bohatá na histidin (tzv. histidinová kotva), která byla využita při izolaci daného proteinu.



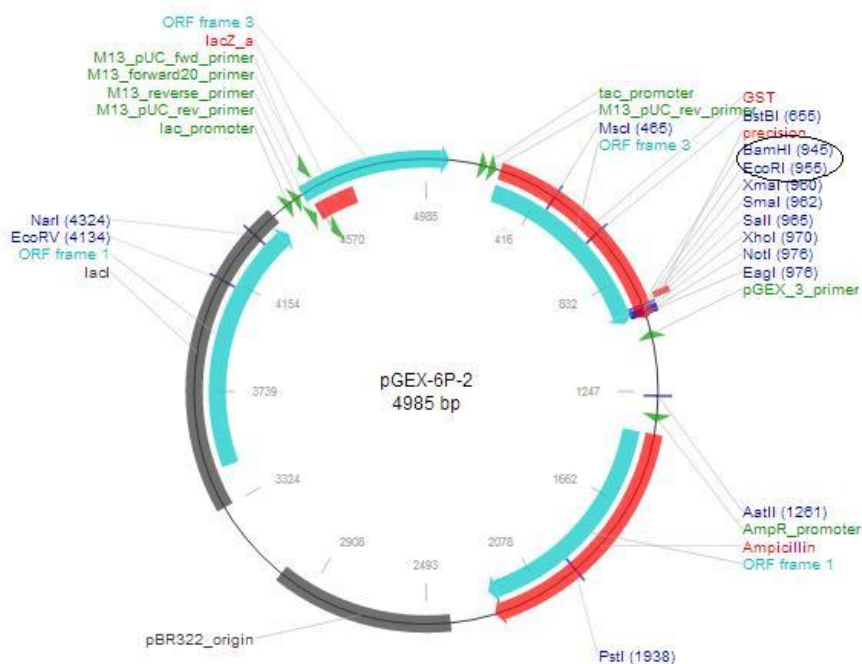
Obrázek 14: Restrikční mapa plasmidu pET-21c(+); převzato z [120]

Na schématu je vyznačena pozice specifických štěpících míst restrikčních endonukleas XhoI a NdeI.

1.5 Plasmid pGEX-6P-2

Pro expresi studovaného RR proteinu byl použit expresní vektor pGEX-6P-2. Mapa tohoto plasmidu je znázorněna na obrázku 15, strana 37. Tento expresní vektor obsahuje 4985 párů bazí. Plasmid pGEX-6P-2 obsahuje gen kódující glutathion S-transferasu (GST) [123]. V blízkosti tohoto genu jsou specifická místa pro restrikční endonukleasy – BamHI a EcoRI prostřednictvím kterých je do tohoto plasmidu vložen gen kódující studovaný RR protein.

Expresí GST (a s ním i studovaného RR proteinu) je pod kontrolou tac promotoru. Dále se v tomto expresním vektoru nachází gen *lacI*. Produkt tohoto genu je represorem, který se váže k operátoru tac promotoru, čímž zabrání expresi GST-RR proteinu. Represor je odstraněn po přidavku induktoru (IPTG) a tím dochází k efektivní expresi GST-RR proteinu [124]. Připojením GST k RR proteinu je umožněna purifikace proteinu z bakteriálního lyzátu prostřednictvím afinitní chromatografie s použitím glutathionu jako elučního činidla [122]. Pro expresi proteinu s připojeným GST je nutné vybrat vhodný bakteriální kmen. U řady bakteriálních kmenů *E. coli* dochází k produkci proteas, které připojený GST odštěpují [125]. Pro efektivní expresi RR proteinu s připojeným GST byly proto použity bakterie *E. coli* BL-21, které jsou upraveny tak, aby neprodukovaly proteasy OmpT a Lon [126]. Expresní vektor pGEX-6P-2 disponuje genem, který uděluje bakterii rezistenci vůči ampicilinu.



Obrázek 15: Restriční mapa plazmidu pGEX-6P-2; převzato z [123]

Na schématu je vyznačena pozice specifických štěpicích míst restrikčních endonukleas BamHI a EcoRI

2 Cíle diplomové práce

Na začátku řešení dané diplomové práce byly stanoveny tyto cíle:

- Nejprve bylo třeba optimalizovat protokol heterologní exprese a izolačního postupu *AfGcHK* a získat tak vhodný, enzymově aktivní preparát proteinu *AfGcHK*.
- Stejně tak bylo nezbytné připravit i druhý protein z dvousložkového signálního systému, konkrétně RR protein.
- Hlavním cílem diplomové práce bylo studovat mechanismy fosforylačních reakcí *AfGcHK* a RR proteinu a s tím souvisela nutnost zavést vhodnou metodu pro sledování a detekci fosforylovaných forem studovaných proteinů.
- Dále bylo třeba optimalizovat podmínky pro průběh studovaných enzymových reakcí.
- Finální náplň diplomové práce pak spočívala ve stanovení kinetických parametrů autofosforylační reakce *AfGcHK* za různých podmínek.

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
Centrifugy	5415 R, Eppendorf Allegro X-22R, Beckman Coulter Janetzki K 70 D, MLW Stolní minicentrifuga Gilson, GmC Lab Ultracentrifuga Optima™ LE-80K, Beckman Coulter
Čtečka mikrotitračních destiček	Sunrise Absorbance Reader, TECAN
Elektrický ohříváč	ETA
Elektroforetická aparatura	Mini-PROTEAN Tetra Cell, Biorad
Inkubátory	IR 1500 Automatic CO2 Incubator, Flow Laboratories Mini Rocker MR-1, BioSan ORBI-SAFE TS Net Wise, Gallenkamp
Laboratorní váhy	440-35N, KERN EW 600-2M, KERN EK600H A&D Instruments LTD
Laminární box	BIO 126, Labox
Magnetická míchačka	KMO2 basic, IKA
pH metr	model 370, ATI Orion
Spektrofotometry	Spekol 11, CARLZEISS, Jena Diod Array 8453, Agilent Cary 60 UV-Vis, Agilent
Ultrazvukový homogenizátor	Sonopuls HD 3100, sonda KE 76, Bandelin
Vodní lázeň	Julabo TW2, Biotech
Zdroj pro elektroforesu	EPS 301, Electrophoresis Power Supply, Amersham Pharmacia Biotech
ÄKTAbasic systém	Amersham
ÄKTAprime plus systém	GE, Healthcare

3.2 Použitý materiál a chemikálie

AppliChem, Německo

δ -aminolevulová kyselina (δ -ALA)

Clontech, USA

TALON® Metal Affinity Resin

Fermentas, Kanada

Marker Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder

Fluka, Švýcarsko

Akrylamid, dodecylsulfát sodný (SDS), fenylmethansulfonyl florid (PMSF), lysozym, merkaptoethanol, N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)

GE Healthcare, Anglie

Glutathione Sepharose 4B

LACHEMA BRNO, ČR

Bromfenolová modř, diethylether, Dihydrogenfosforečnan draselný, dithioničitan sodný, dusičnan stříbrný, ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), formaldehyd, hemin, hydrogenfosforečnan sodný, hydroxid sodný, chlorid draselný, chlorid hořečnatý, chlorid manganatý, chlorid vápenatý, imidazol, octan sodný, pentahydrát síranu měďnatého, persíran amonný, pyridin, thiosíran sodný, uhličitan sodný, vinan sodný

Lach-Ner, ČR

Aceton, amoniak, ethanol, glycerol, chlorid sodný, kyselina chlorovodíková, kyselina octová, methanol

Linde, ČR

Dusík (g)

New England BioLabs, USA

Hovězí sérový albumin

OXOID LTD, Anglie

Bacto Tryptone, Bacto Yeast

Penta, ČR

Hydrogenfosforečnan draselný, glycin, dithioničitan sodný, fosforylchlorid

SIGMA, USA

Dimethylsulfoxid, draselná sůl fosfoenolpyruvátu, glutathion, isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG), lithno-draselná sůl acetylfosfátu, Luria Agar, Luria Broth (LB) medium, 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina

Sigma-Aldrich, USA

Lithná sůl adenosin 5'-(β,γ -imido)trifosfátu (ATP^A)

SERVA Elektrophoresis, Německo

Ampicilin, Coomassie Brilliant Blue R-250, disodná sůl adenosin-5'-trifosfátu (ATP), N, N, N', N'-tetramethylethyldiimin (TEMED)

Stratagen, USA

Bakteriální kmen *E. coli* BL-21(DE3)

Wako Pure Chemical Industries, Japonsko

Phos-tag

Plasmidy pET-21c(+)/Anae109_2438 (pro AfGcHK) a pGEX-6P-2/Anae109_2439 (pro RR protein) byly laskavě poskytnuty spolupracující laboratoří profesora Toru Shimizu, Tohoku Universita, Sendai, Japonsko.

3.3 Použité metody

3.3.1. Příprava agarových ploten

Navážka 4 g LB agaru byla rozpuštěna ve 100 ml destilované vody. Po převedení do zásobní lahve bylo toto množství LB agaru sterilizováno horkou parou při teplotě 121 °C (Varioklav 400E, H+P Labortechnik) po dobu 20 minut. Těsně před použitím byl LB agar rozpuštěn zahříváním v mikrovlnné troubě a potřebné množství bylo přeneseno do sterilní zkumavky Falcon (50 ml). Po zchladnutí byl do zkumavky Falcon naplněné agarem přidán ampicilin o výsledné koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tato směs byla jemně promíchána a poté aplikována do sterilních Petriho misek. Petriho misky byly ponechány na vodorovném povrchu do ztuhnutí agaru.

3.3.2 Transformace buněk *E. coli* BL-21 (DE3) teplotním šokem

Kompetentní buňky *E. coli* a vektory byly po vyjmutí z mrazáku ponechány na ledu rozmraznout. Buňky byly rozděleny do dvou sterilních mikrozkuvek Eppendorf (do

každé bylo napipetováno 30 μl suspenze kompetentních buněk). Do jedné z mikrozkušavek byl přidán 1 μl roztoku plasmidu ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), do druhé kontrolní mikrozkušavky byl přidán 1 μl sterilní vody (kontrolní buňky). Obě mikrozkušavky byly ponechány přibližně 30 minut na ledu. Poté byly buňky podrobeny teplotnímu šoku ponořením mikrozkušavek na 45 sekund do vodní lázně (Julabo TW2, Biotech) vyhřáté na $42 \text{ }^\circ\text{C}$. Po vyjmutí z vodní lázně byly mikrozkušavky přeneseny na led. Po uplynutí tří minut bylo k transformovaným i kontrolním buňkám přidáno 300 μl sterilního LB média ($25 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) a obsah mikrozkušavek byl šetrně promíchán. Buňky byly poté inkubovány 60 minut při teplotě $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (IR 1500 Automatic CO_2 Incubator, Flow Laboratories). Po inkubaci byly buněčné suspenze napipetovány na agarové plotny s ampicilinem a sterilní mikrobiologickou hokejkou rovnoměrně rozetřeny po celé ploše. Po vsáknutí suspenze do agaru byly plotny otočeny dnem vzhůru, uzavřeny parafilmem a inkubovány přes noc při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (IR 1500 Automatic CO_2 Incubator, Flow Laboratories).

3.3.3 Expres proteinu AfGcHK a RR proteinu

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

Z „narostlých“ kultur transformovaných buněk byla pomocí vyžíhané pinzety a sterilního párátko selektována jedna kolonie buněk. Párátka, obsahující stopy selektované buněčné kolonie, bylo vloženo do zkumavky Falcon (50 ml) obsahující 5 ml sterilního LB média ($25 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) s ampicilinem ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Zkumavka obsahující buňky selektovaného jednobuněčného klonu byla inkubována v orbitálním shakeru (ORBI-SAFE TS Net Wise, Gallenkamp) při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a 220 RPM přes noc.

Bylo připraveno TB medium. Navážka 48 g Bacto Tryptone a 96 g Bacto Yeast byla rozpuštěna ve 3,6 l destilované vody. Do 8 Erlenmayerových lahví (2 l) bylo přidáno 450 ml tohoto roztoku. Po uzavření alobalovou zátkou byly roztoky v těchto lahvích sterilizovány horkou parou při teplotě $121 \text{ }^\circ\text{C}$ (Varioklav 400E, H+P Labortechnik) po dobu 20 minut. Navážky 50 g hydrogenfosforečnanu draselného a 9,2 g dihydrogenfosforečnanu draselného byly rozpuštěny v 300 ml destilované vody. Za stálého míchání bylo k tomuto roztoku přidáno 32 ml 50% glycerolu. Tato směs byla doplněna destilovanou vodou na 400 ml a sterilizována analogicky jako roztoky v Erlenmayerových lahvích. Těsně před použitím bylo k 450 ml sterilního roztoku Bacto Tryptone a Bacto Yeast přidáno 50 ml roztoku obsahujícího hydrogenfosforečnan draselný, dihydrogenfosforečnan draselný a glycerol.

Do 8 Erlenmayerových lahví (2 l) obsahujících 500 ml sterilního TB média bylo přidáno 0,5 ml ampicilinu (100 mg.ml⁻¹). Inokulace byla provedena 0,5 ml suspenze obsahující transformované buňky *E. coli* BL-21(DE3) ze selektovaného jednobuněčného klonu. Výsledná směs byla inkubována v orbitálním shakeru (ORBI-SAFE TS Net Wise, Gallenkamp) při 37 °C a 180 RPM do doby, než optická denzita při 600 nm buněk *E. coli* v médiu dosáhla hodnoty v rozmezí 0,6 – 1,2 (k měření optické denzity byl použit spektrofotometr Spekol 11, CARLZEISS, Jena).

3.3.3.2 Indukce exprese genu kódující protein AfGcHK/RR protein

Jakmile bakteriální kultura, připravená podle postupu popsaného v kapitole 3.3.3.1, strana 42 dosáhla požadovaných hodnot optické denzity při 600 nm, byla ukončena inkubace při 37 °C a dále bylo pokračováno inkubací po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Poté byla provedena indukce 0,1 ml IPTG (0,5 M). Během optimalizace izolačního postupu holoformy AfGcHK byl proveden experiment, kdy bylo v tomto kroku přidáno k bakteriální kultuře 0,5 ml respektive 1,0 ml δ -ALA (0,5 M). Následovala inkubace v orbitálním shakeru (ORBI-SAFE TS Net Wise, Gallenkamp) při 15 °C a 180 RPM přes noc. Exprese genu kódující protein AfGcHK respektive RR protein byla ukončena centrifugací (Janetzki K 70 D, MLW) při 4 °C a 3000 RPM po dobu 45 minut. Sklizené buňky byly po zvážení uchovány při -80 °C pro další využití.

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

Zmražené suspendované buňky (přibližně 6 g) obsahující exprimovaný protein AfGcHK byly rozmrazeny na ledu. Následovala resuspendace buněk ve 40 ml pufru obsahujícím 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM chlorid sodný, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,2 mg.ml⁻¹ lysozym. Poté byly za stálého chlazení na ledu a míchání narušeny buněčné membrány pomocí ultrazvukové sonikace (Sonopuls HD 3100, sonda KE 76, Bandelin). Ultrazvuková sonikace byla provedena šestkrát po dobu 1 minuty při amplitudě 55 %. Mezi jednotlivými sonikacemi byla vždy 1 minutová pauza. K získanému homogenizátu byl přidán hemin rozpuštěný v dimethylsulfoxidu o výsledné koncentraci 300 μ M (během optimalizace izolace AfGcHK z buněk *E. coli* byl použit hemin o výsledné koncentraci 750 μ M, v případě, kdy byla provedena exprese s přídavkem δ -ALA byl tento krok zcela vynechán). Tato směs byla inkubována za stálého míchání při 4 °C 20 minut. Pro získání cytosolu byl homogenizát centrifugován při 55 000 RPM při 4 °C po dobu 70 minut (Ultracentrifuga Optima™ LE-80K, Beckman Coulter).

Čtyři mililitry afinitního gelu (TALON® Metal Affinity Resin) byly ekvilibrovány pufrům obsahujícím 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 a 100 mM chlorid sodný centrifugací při 4 °C a 750 RPM (Allegro X-22R, Beckman Coulter). Ekvilibrovaný afinitní gel byl přidán k cytosolu a tato směs byla inkubována za stálého míchání (Mini Rocker MR-1, BioSan) po dobu 60 minut při 4 °C. Po inkubaci byla tato směs aplikována na prázdnou chromatografickou kolonu s fritou. Kolona byla promyta 80 ml pufru obsahujícím 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 a 100 mM chlorid sodný. Byly zachyceny proteinové frakce eluované 10 ml pufru obsahujícím 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM chlorid sodný a 10 mM imidazol, další proteinová frakce byla získána elucí 10 ml pufru obsahujícím 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM chlorid sodný a 20 mM imidazol a finální proteinová frakce pak byla získána elucí 10 ml pufru obsahujícím 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM chlorid sodný a 200 mM imidazol. V dalším kroku bylo nutné odstranit imidazol z těchto frakcí. Při prvních experimentech testování tří protokolů heterologní exprese a izolačního postupu byla finální proteinová frakce dialyzována 3 x proti 20 mM Tris-HCl, pH 8,0. Od tohoto dialyzačního kroku však bylo později odstoupeno a byl nahrazen krokem gelové filtrační chromatografie.

Finální proteinová frakce eluovaná pufrům obsahujícím 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM chlorid sodný a 200 mM imidazol z afinitní chromatografie byla přenesena do zkumavky s membránou, která zadrží proteiny s molekulovou hmotností větší než 30 kDa, tzv. „cut off“ 30 kDa a centrifugována při 4 °C a 4 500 RPM (Allegro X-22R, Beckman Coulter) do doby, než byl objem frakce zmenšen přibližně na 1,5 ml. Obsah zkumavky byl každé dvě minuty šetrně promícháván pomocí automatické pipety. Zakoncentrovaná frakce byla přenesena do mikrozkušavky Eppendorf a centrifugována při 13 200 RPM (5415 R, Eppendorf) při 4 °C 20 minut. Pro odstranění nežádoucích látek (imidazol) a vysokomolekulárních proteinových agregátů byla provedena gelová filtrační chromatografie s využitím ÄKTAbasic systému pro kapalínovou chromatografii (Amersham). Byla použita kolona Superdex 200 10/30 GL (Amersham). Kolona byla ekvilibrována 20 ml pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl, 150 mM chlorid sodný pH 8,0. Poté byl na kolonu aplikován vzorek (500 µl) rychlostí 0,5 ml.min⁻¹. Detekce eluovaného roztoku byla provedena při vlnové délce 280 nm. Byly jímány pouze frakce z hlavního proteinového píku (eluční objem byl přibližně 14,3 ml). Tyto frakce byly přeneseny do zkumavky s membránou, která zadrží proteiny s molekulovou hmotností větší než 30 kDa, tzv. „cut off“ 30 kDa a centrifugovány při 4 °C a 4 500 RPM (Allegro X-22R, Beckman

Coulter) do doby, než byl objem směsi přibližně 500 μ l. Obsah zkumavky byl každé dvě minuty šetrně promícháván pomocí automatické pipety. Získaný preparát byl rozdělen do alikvotů, zmrazen pomocí kapalného dusíku a uchován při -80 °C.

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

Zmražené suspendované buňky (přibližně 6 g), obsahující RR protein byly šetrně rozmrazeny na ledu. Poté byly buňky resuspendovány ve 40 ml pufru obsahujícím 10 mM hydrogenfosforečnan sodný, 1,8 mM dihydrogenfosforečnan draselný, pH 7,5; 140 mM chlorid sodný; 2,7 mM chlorid draselný, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF a 0,2 mg/ml lysozym. Za použití ultrazvukové sonikace za stálého míchání a chlazení na ledu byly narušeny buněčné membrány (Sonopuls HD 3100, sonda KE 76, Bandelin). Ultrazvuková sonikace byla provedena šestkrát po dobu 1 minuty při amplitudě 55 %. Mezi jednotlivými sonikacemi byla vždy 1 minutová pauza. Následovala centrifugace při 55 000 RPM při 4 °C po dobu 70 minut (Ultracentrifuga Optima™ LE-80K, Beckman Coulter).

Čtyři mililitry afinitního gelu (Glutathione Sepharose 4B) byly převedeny do pufru obsahujícího 10 mM hydrogenfosforečnan sodný, 1,8 mM dihydrogenfosforečnan draselný, pH 7,5; 140 mM chlorid sodný a 2,7 mM chlorid draselný centrifugací při 4 °C a 750 RPM (Allegro X-22R, Beckman Coulter). Takto ekvilibrovaný afinitní gel byl přidán k cytosolu a tato směs byla inkubována po dobu 60 minut za stálého míchání (Mini Rocker MR-1, BioSan) při 4 °C. Poté byla směs převedena na prázdnou chromatografickou kolonu s fritou. Kolona byla promyta 100 ml pufru obsahujícího 10 mM hydrogenfosforečnan sodný, 1,8 mM dihydrogenfosforečnan draselný, pH 7,5; 140 mM chlorid sodný a 2,7 mM chlorid draselný. Byla zachycena výsledná proteinová frakce eluovaná 20 ml elučního pufru (50 mM Tris-HCl, pH 8,0 obsahující 10 mM glutathion). V dalším kroku bylo nutné z této frakce odstranit přebytečný glutathion. Toho bylo dosaženo pomocí gelové filtrační chromatografie.

Finální proteinová frakce eluovaná elučním pufrem obsahujícím 50 mM Tris-HCl , pH 8,0 a 10 mM glutathion z afinitní chromatografie byla přenesena do zkumavky s membránou, která zadrží proteiny s molekulovou hmotností větší než 30 kDa, tzv. „cut off“ 30 kDa a centrifugována při 4 °C a 4 500 RPM (Allegro X-22R, Beckman Coulter) do doby, než byl objem frakce zmenšen přibližně na přibližně 1,5 ml. Obsah zkumavky byl každé dvě minuty šetrně promícháván pomocí automatické pipety. Zakoncentrovaná frakce byla přenesena do mikrozkušavky Eppendorf a centrifugována při 13 200 RPM (5415 R,

Eppendorf) při 4 °C 20 minut. Pro odstranění nežádoucích látek (glutathion) a vysokomolekulárních proteinových agregátů byla provedena gelová filtrační chromatografie s využitím ÄKTAbasic systému pro kapalinovou chromatografii (Amersham). Byla použita kolona Superdex 200 10/30 GL (Amersham). Kolona byla ekvilibrována 20 ml pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl, 150 mM chlorid sodný, pH 8,0. Poté byl na kolonu aplikován vzorek (500 µl) rychlostí 0,5 ml.min⁻¹. Detekce eluovaných látek byla prováděna průtokovým spektrofotometrem (při 280 nm). Byly jímány pouze frakce z hlavního píku (eluční objem byl přibližně 13,3 ml). Tyto frakce byly přeneseny do zkumavky s membránou, která zadrží proteiny s molekulovou hmotností větší než 30 kDa, tzv. „cut off“ 30 kDa a centrifugovány při 4 °C a 4 500 RPM (Allegro X-22R, Beckman Coulter) do doby, než byl objem směsi zmenšen přibližně na 500 µl. Obsah zkumavky byl každé dvě minuty šetrně promícháván pomocí automatické pipety. Získaný preparát byl rozdělen do alikvotů, zmrazen pomocí kapalného dusíku a uchován při -80 °C.

3.3.6 Stanovení koncentrace hemu v holoforně proteinu AfGcHK

Do křemenné kyvety byla napipetována směs obsahující 8 µl proteinu AfGcHK, 160 µl 100% pyridinu, 8 µl hydroxidu sodného (10 M) a 624 µl destilované vody. Tato směs byla použita jako slepý vzorek. Poté bylo do směsi přidáno několik krystalků dithioničitanu sodného a bylo proměřeno spektrum v rozsahu 400-600 nm (Diod Array 8453, Agilent).

Koncentrace hemu ve vzorku byla vypočtena ze vztahu:

$$c_{\text{hem}} = \frac{A(556) - A(538)}{\varepsilon} \quad (3.1)$$

kde c_{hem} je koncentrace hemu, $A(556)$ absorbance při vlnové délce 556 nm, $A(538)$ absorbance při vlnové délce 538 nm a ε je molární absorpční koeficient ($\varepsilon = 24,7 \text{ dm}^3 \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [127].

3.3.7 Stanovení Rz poměru

Rz poměr vyjadřuje koncentraci molekul hemu koordinovaných specificky s proteinem vzhledem ke koncentraci proteinu. Pro stanovení Rz poměru byl vzorek proteinu AfGcHK 100 x naředěn 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 a bylo měřeno spektrum v rozsahu 250 – 700 nm (Diod Array 8453, Agilent). Rz poměr byl vypočítán jako podíl absorbance při vlnové délce 413 nm (A_{413}) a absorbance při vlnové délce 280 nm (A_{280}).

3.3.8 Stanovení koncentrace proteinů metodou využívající přítomnost bicinchoninové kyseliny v reakčním činidle

Činidlo pro stanovení koncentrace proteinu bylo připraveno rozpuštěním bicinchoninové kyseliny v 50 dílech roztoku obsahujícím 0,4% hydroxid sodný, 0,95% hydrogenuhličitan sodný, 2% dekahydrát uhličitanu sodného, 0,16% vinan sodný, pH 11,25 a 1 dílu 4% pentahydrátu síranu měďnatého tak, aby výsledná koncentrace bicinchoninové kyseliny v činidle byla 1%. Jako standard pro kalibraci byly použity roztoky hovězího sérového albuminu o následujících koncentracích: 2,0; 1,5; 1,0; 0,75; 0,50; 0,25; 0,125 mg.ml⁻¹. Z hodnot absorbancí při vlnové délce 562 nm těchto standardních roztoků hovězího sérového albuminu po přidavku činidla a inkubaci byla stanovena kalibrační křivka. Z této křivky pak byla odečtena hodnota koncentrace stanovovaného proteinu. Inkubace probíhala tak, že k 9 µl roztoku bylo přidáno 260 µl činidla. Inkubace byly prováděny v 96-jamkové titrační destičce při 37 °C (IR 1500 Automatic CO₂ Incubator, Flow Laboratories) po dobu 30 minut. Po zchladnutí při laboratorní teplotě byla naměřena absorbance příslušných standardů a vzorků stanovovaných proteinů pomocí čtečky mikrotitračních destiček (Sunrise Absorbance Reader, TECAN) při vlnové délce 562 nm. Každá koncentrace proteinu byla stanovena nejméně ve třech paralelních inkubacích. K vyhodnocení naměřených dat byl použit program Kim32.

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

Byla sestavena aparatura pro SDS elektroforesu (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Biorad) se dvěma čistými a odmaštěnými skly. Mezi tato skla byl pomocí automatické pipety přenesen roztok, který pro 12% separační gel byl připraven smícháním 3,0 ml pufru A (0,375 M Tris-HCl; 0,1% SDS; pH 8,8), 2,0 ml polymeračního roztoku A (30% akrylamid; 0,8% BIS v pufru A), 5 µl TEMEDu a 50 µl roztoku persíranu amonného (100 mg.ml⁻¹). Na tento aplikovaný roztok byla šetrně napipetována vrstva destilované vody. Po polymeraci separačního gelu (30 minut) byla vrstva vody odlita a povrch separačního gelu byl vysušen filtračním papírem. Separační gel byl převrstven roztokem, který pro výsledný 4% zaostřovací gel byl připraven smícháním 1,7 ml pufru B (0,125 M Tris-HCl; 0,1% SDS; pH 6,8), 267 µl polymeračního roztoku B (30% akrylamid; 0,8% BIS v pufru B), 2 µl TEMEDu a 40 µl persíranu amonného (100 mg.ml⁻¹). Do tohoto roztoku byl vložen hřeben

pro vytvoření jamek k nanášení vzorků. Po polymeraci (20 minut) byl vyjmut hřeben ze zaostřovacího gelu, desky s gelem byly přeneseny do elektrodové vany a elektrodový protstor byl naplněn elektrodovým pufrem (0,025 M Tris; 0,192 M glycin; 0,1% SDS; pH 8,3).

Vzorky byly naředěny tak, aby obsahovaly 0,2 – 1,0 mg proteinu na jamku. Poté byly smíchány s odpovídajícím množstvím 4 x koncentrovaného vzorkového redukujícího pufru (0,25 M Tris-HCl, pH 6,8; 8% SDS; 40% glycerol; 20% 2-merkptoethanol; 0,008% bromfenolová modř). Výsledná směs byla po dobu 5 minut vystavena teplotě 100 °C ve vodní lázni. Poté byly vzorky krátce centrifugovány (stolní minicentrifuga Gilson, GmC Lab) a důkladně promíchány. Do vytvořených jamek zaostřovacího gelu bylo pomocí stříkačky Hamilton nanášeno 5 μ l vzorků nebo markeru (Marker SpectraTM Multicolor Broad Range Protein Ladder). Elektroforesa probíhala ve vertikálním uspořádání při napětí 200 V po dobu 70 minut při laboratorní teplotě.

Po ukončení elektroforesy byl oddělen separační gel, který byl přenesen do Petriho misky s barvicí lázní (0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250; 46% ethanol; 9,2% kyselina octová). Po 60 minutách intenzivního třepání, kdy byl gel dostatečně obarven, byl přemístěn do Petriho misky s odbarvovací lázní (25% ethanol; 10% kyselina octová). Po 20 minutách byla lázeň vyměněna a v ní byl gel ponechán do doby, než byl dostatečně odbarven (přibližně 4 hodiny). Poté byl gel převeden do elektronické formy naskenováním (Scanjet G3010, HP).

3.3.10 Diskontinuální elektroforesa na polyakrylamidovém gelu obsahujícím Phos-tag v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE-Phos-tag)

Byla sestavena aparatura pro SDS elektroforesu (Mini-PROTEA Tetra Cell, Biorad) se dvěma čistými a odmaštěnými skly. Mezi tato skla byl pomocí automatické pipety přenesen roztok, který pro výsledný 10% separační gel obsahující 50 μ M Phos-tag a 200 μ M chlorid manganatý byl připraven smícháním 3,25 ml pufru A (0,375 M Tris-HCl; 0,1% SDS; pH 8,8), 1,63 ml polymeračního roztoku A (30% akrylamid; 0,8% BIS v pufru A), 5 μ l TEMEDu, 50 μ l roztoku persíranu amonného (100 mg. ml^{-1}), 25 μ l roztoku Phos-tagu (10 mg v 1,68 ml sterilizované vody) a 100 μ l roztoku chloridu manganatého (2 g. l^{-1}). Roztok pro 8% separační gel obsahující 100 μ M Phos-tag a 200 μ M chlorid manganatý byl připraven smísením 3,6 ml pufru A, 1,25 ml polymeračního roztoku A, 4,8 μ l TEMEDu, 48 μ l persíranu amonného, 50 μ l roztoku Phos-tagu a 100 μ l roztoku chloridu

manganatého. Roztok pro 10% separační gel obsahující 75 μM Phos-tag a 200 μM chlorid manganatý byl připraven smícháním 3,25 ml pufru A, 1,63 ml polymeračního roztoku A, 4,87 μl TEMEDu, 48,7 μl roztoku persíranu amonného, 37,5 μl roztoku Phos-tagu a 100 μl roztoku chloridu manganatého. Na tento aplikovaný roztok byla šetrně napipetována vrstva destilované vody. Po polymeraci gelu (30 minut) byla vrstva vody odlita a povrch separačního gelu byl vysušen filtračním papírem.

Separací gel byl převrstven zaostřovacím gelem. Roztok pro výsledný 4% zaostřovací gel byl připraven smícháním 1,7 ml pufru B (0,125 M Tris-HCl; 0,1% SDS; pH 6,8), 267 μl polymeračního roztoku B (30% akrylamid; 0,8% BIS v pufru B), 2 μl TEMEDu a 40 μl persíranu amonného (100 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Do tohoto roztoku byl vložen hřeben pro vytvoření jamek k nanášení vzorků. Po polymeraci (20 minut) byl vyjmut hřeben ze zaostřovacího gelu, desky s gelem byly přeneseny do elektrodové vany a elektrodový prostor byl naplněn elektrodovým pufrem (0,025 M Tris; 0,192 M glycin; 0,1% SDS; pH 8,3).

Vzorky obsahovaly 2 x koncentrovaný vzorkový redukující pufr (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 10% 2-merkptoethanol; 0,004% bromfenolová modř). Nikdy nebyly vystaveny teplotě 100 °C. Vzorky byly krátce centrifugovány (stolní minicentrifuga Gilson, GmC Lab) a před aplikací byly důkladně promíchány. Do vytvořených jamek zaostřovacího gelu bylo pomocí stříkačky Hamilton nanášeno 2,5 – 7,0 μl vzorků. Elektroforesa probíhala ve vertikálním uspořádání při napětí 200 V po dobu 70 minut při laboratorní teplotě.

Po ukončení elektroforesy byl oddělen separační gel, který byl přenesen do Petriho misky, s barvicí lázní (0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250; 46% ethanol; 9,2% kyselina octová). Po 60 minutách intenzivního třepání, kdy byl gel dostatečně obarven, byl přemístěn do Petriho misky s odbarvovací lázní (25% ethanol; 10% kyselina octová). Po 20 minutách byla lázeň vyměněna a v ní byl gel ponechán do doby, než byl dostatečně odbarven (přibližně 4 hodiny). Odbarvený gel byl převeden do elektronické podoby naskenováním (Scanjet G3010, HP) a vyhodnocen v programu ImageJ. Byly odečteny plochy píků. Pokud byla výše popsaná metoda použita jako nástroj pro určení kinetických parametrů studovaných enzymových reakcí jsou detaily tohoto stanovení popsány v kapitole 3.3.17, strana 63.

V případě, kdy byla vizualizace proteinů prostřednictvím barvení roztokem Coomassie Brilliant Blue R250 nedostatečná, byla použita metoda barvení stříbrem. Tato

metoda je až 100 x citlivější než běžně používaná „Coomasie metoda“ [128]. Gel byl 60 minut inkubován za stálého míchání v 50 ml fixačního roztoku (50% methanol, 12% kyselina octová, 0,0185% formaldehyd), poté byl za stálého míchání třikrát promyt po dobu 5 minut 50 ml 50% roztoku ethanolu, poté 1 minutu 50 ml 0,2% roztoku thiosíranu sodného a následně 3 x 20 sekund 50 ml destilované vody. Poté byl gel inkubován 20 minut v 50 ml impregnačního roztoku (2,0 g.l⁻¹ dusičnan stříbrný, 0,0185% formaldehyd). Po této inkubaci byl gel propláchnut 2 x 20 sekund 50 ml destilované vody a následně bylo ke gelu přidáno 50 ml vyvolávacího roztoku (60 g.l⁻¹ uhličitan sodný, 0,0185% formaldehyd a 2 g.l⁻¹ thiosíran sodný). Po 3 minutách byl vyvolávací roztok odmyt 50 ml destilované vody a reakce byla ukončena přidávkem 50 ml 1,5% roztoku EDTA (0,75 g v 50 ml destilované vody). Poté byl gel promyt 3 x po dobu 5 minut 50 ml destilované vody. Odbarvený gel byl převeden do elektronické podoby naskenováním (Scanjet G3010, HP) a vyhodnocen v programu ImageJ. Byly odečteny plochy píků.

3.3.11 Optimalizace podmínek pro studium enzymových reakcí proteinu AfGCHK

3.3.11.1 Teplotní závislost autofosforylace AfGCHK

Pro stanovení autofosforylační aktivity AfGCHK byl nejprve vytvořen premix, který byl rozdělen do jednotlivých alikvotů. Složení každého alikvotu o finálním objemu 100 µl bylo následující: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý a 10 µM AfGCHK. Alikvoty byly preinkubovány 5 minut při odlišných teplotách 0 °C, 10 °C, 20 °C, 30 °C, 37 °C, 50 °C, 60 °C. Poté byla zahájena reakce přidávkem ATP o výsledné koncentraci 1 mM. Reakční směsi byly inkubovány 15 minut při příslušné teplotě. Reakce byly ukončeny přidávkem 100 µl 2 x koncentrovaného vzorkového redukujícího pufru (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 10% 2-merkptoethanol; 0,004% bromfenolová modř). Vzorky byly analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE-Phos-tag (za použití 10% separačního gelu obsahujícího 50 µM Phos-tag a 200 µM chlorid manganatý).

3.3.11.2 Časová závislost autofosforylace AfGCHK

Pro stanovení autofosforylační aktivity AfGCHK byl nejprve vytvořen premix, který byl rozdělen do jednotlivých alikvotů. Složení každého alikvotu o finálním objemu 100 µl bylo následující: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý a 10 µM AfGCHK. Alikvoty byly preinkubovány 5 minut při laboratorní teplotě.

Reakce byly zahájeny přidavkem ATP o výsledné koncentraci 1 mM. Reakční směsi byly inkubovány 0 min, 1 min, 5 min, 15 min, 30 min, 60 min a 120 min a reakce probíhaly při 20 °C. Reakce byly ukončeny přidavkem 100 µl 2 x koncentrovaného vzorkového redukujícího pufru (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 10% 2-merkptoethanol; 0,004% bromfenolová modř). Vzorky byly analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE-Phos-tag (za použití 10% separačního gelu obsahujícího 75 µM Phos-tag a 200 µM chlorid manganatý).

3.3.11.3 Závislost autofosforylace AfGcHK na pH prostředí

Pro studium vlivu pH prostředí na autofosforylační aktivitu AfGcHK byl nejprve vytvořen premix, který byl rozdělen do jednotlivých alikvotů. Složení každého alikvotu o finálním objemu 100 µl bylo následující: 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 µM AfGcHK a pufr o příslušném pH. Pro pH prostředí 5,5; 6,0; 6,5 a 7,0 byl použit fosfátový pufr (100 mM hydrogenfosforečnan sodný a 100 mM dihydrogenfosforečnan sodný), pro pH prostředí 7,5; 8,0; 8,5 a 9,0 byl použit 100 mM Tris-HCl pufr, pro pH prostředí 9,5; 10,0; 10,5; 11,0; 11,5 byl použit 100 mM glycinový pufr.

Pro testování vlivu extrémního pH prostředí na autofosforylační aktivitu AfGcHK byl vytvořen premix, který byl rozdělen do alikvotů. Složení alikvotů o výsledném objemu 100 µl bylo následující: 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 µM AfGcHK a 50 mM (pro pH prostředí 12,7), respektive 100 mM (pro pH prostředí 13,0) hydroxid sodný.

Pro porovnání autofosforylační aktivity AfGcHK v různých pufrech (glycinový a Tris-HCl) majících stejné pH (9,0) byla vytvořena směs, o výsledném objemu 100 µl, obsahující 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 µM AfGcHK a 100 mM glycinový pufr.

Po preinkubaci 5 minut při laboratorní teplotě byly reakce zahájeny přidavkem ATP o výsledné koncentraci 1 mM. Reakční směsi byly inkubovány 1 minutu při teplotě 20 °C. Ukončení reakcí bylo provedeno přidavkem 100 µl 2 x koncentrovaného vzorkového redukujícího pufru (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 10% 2-merkptoethanol; 0,004% bromfenolová modř). Vzorky byly analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE-Phos-tag (za použití 10% separačního gelu obsahujícího 75 µM Phos-tag a 200 µM chlorid manganatý).

3.3.12 Optimalizace podmínek pro studium procesu fosforylace RR proteinu

3.3.12.1 Teplotní závislost stupně fosfotransferu na RR protein

Pro stanovení stupně fosfotransferu na RR protein byl nejprve vytvořen premix, který byl rozdělen do jednotlivých alikvotů. Složení každého alikvotu o finálním objemu 100 μ l bylo následující: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M AfGcHK a 10 μ M RR protein. Alikvoty byly preinkubovány 5 minut při odlišných teplotách 0 °C, 10 °C, 20 °C, 30 °C, 37 °C, 50 °C, 60 °C. Poté byly zahájeny reakce přidavkem ATP o výsledné koncentraci 1 mM. Reakční směsi byly inkubovány 15 minut při příslušné teplotě. Reakce byly ukončeny přidavkem 100 μ l 2 x koncentrovaného vzorkového redukujícího pufru (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 10% 2-merkptoethanol; 0,004% bromfenolová modř). Vzorky byly analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE-Phos-tag (za použití 10% separačního gelu obsahujícího 50 μ M Phos-tag a 200 μ M chlorid manganatý).

3.3.12.2 Časová závislost stupně fosfotransferu na RR protein

Pro stanovení stupně fosfotransferu na RR protein byl nejprve vytvořen premix, který byl rozdělen do jednotlivých alikvotů. Složení každého alikvotu o finálním objemu 100 μ l bylo následující: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M AfGcHK a 10 μ M RR protein. Alikvoty byly preinkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Reakce byly zahájeny přidavkem ATP o výsledné koncentraci 1 mM. Reakční směsi byly inkubovány 0 min, 1 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min a 45 min a reakce probíhaly při 20 °C. Reakce byly ukončeny přidavkem 100 μ l 2 x koncentrovaného vzorkového redukujícího pufru (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 10% 2-merkptoethanol; 0,004% bromfenolová modř). Vzorky byly analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE-Phos-tag (za použití 10% separačního gelu obsahujícího 75 μ M Phos-tag a 200 μ M chlorid manganatý).

3.3.12.3 Závislost stupně fosfotransferu na RR protein na pH prostředí

Pro stanovení vlivu pH prostředí na fosfotransfer na RR protein byl nejprve vytvořen premix, který byl rozdělen do jednotlivých alikvotů. Složení každého alikvotu o finálním objemu 100 μ l bylo následující: 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M AfGcHK, 10 μ M RR protein a pufr o příslušném pH. Pro pH prostředí 5,5; 6,0; 6,5 a 7,0 byl použit fosfátový pufr (100 mM hydrogenfosforečnan sodný, 100 mM dihydrogenfosforečnan sodný), pro pH prostředí 7,5; 8,0; 8,5 a 9,0 byl použit 100 mM

Tris-HCl pufr, pro pH prostředí 9,5; 10,0; 10,5; 11,0; 11,5 byl použit 100 mM glycinový pufr.

Po preinkubaci alikvotů 5 minut při laboratorní teplotě byly reakce zahájeny přidavkem ATP o výsledné koncentraci 1 mM. Reakční směsi byly inkubovány 1 minutu při teplotě 20 °C. Ukončení reakcí bylo provedeno přidavkem 100 μ l 2 x koncentrovaného vzorkového redukujícího pufru (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 10% 2-merkptoethanol; 0,004% bromfenolová modř). Vzorby byly analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE-Phos-tag (za použití 10% separačního gelu obsahujícího 75 μ M Phos-tag a 200 μ M chlorid manganatý).

3.3.13 Studium mechanismu histidinkinasové reakce AfGCHK a fosfotransferu na RR protein

3.3.13.1 Studium vlivu dvojmocných kationtů na autofosforylaci AfGCHK a na fosforylaci RR proteinu

Nejprve byl vytvořen premix, který byl rozdělen do jednotlivých alikvotů. Složení každého alikvotu o finálním objemu 100 μ l bylo následující: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 10 μ M AfGCHK a 10 μ M RR protein.

Pro studium vlivu hořečnatých, respektive vápenatých kationtů na fosfotransfer z AfGCHK (resp. autofosforylační reakcí vytvořeného P-AfGCHK) na RR protein byl vytvořen premix, který byl rozdělen do jednotlivých alikvotů. Složení každého alikvotu o finálním objemu 100 μ l bylo následující: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, respektive 5 mM chlorid vápenatý, 10 μ M AfGCHK a 10 μ M RR protein.

Pro studium vlivu hořečnatých a zároveň vápenatých kationtů na fosfotransfer z AfGCHK (resp. autofosforylační reakcí vytvořeného P-AfGCHK) na RR protein byl vytvořen premix, který byl rozdělen do jednotlivých alikvotů. Složení každého alikvotu o finálním objemu 100 μ l bylo následující: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 5 mM chlorid vápenatý, 10 μ M AfGCHK a 10 μ M RR protein.

Byl studován také vliv koncentrace hořečnatých kationtů (2,5 mM, 10,0 mM) na fosfotransfer z AfGCHK (resp. autofosforylační reakcí vytvořeného P-AfGCHK) na RR protein. Byl proto vytvořen premix, který byl rozdělen do jednotlivých alikvotů. Složení alikvotů o finálním objemu 100 μ l bylo následující: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM

chlorid draselný, 2,5 mM, respektive 10 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M AfGcHK a 10 μ M RR protein.

Alikvoty byly preinkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Reakce byly zahájeny přidáním ATP o výsledné koncentraci 1 mM. Reakční směsi byly inkubovány 1 minutu a 5 minut při 20 °C. Poté bylo ke směsím přidáno 100 μ l 2 x koncentrovaného vzorkového redukujícího pufru (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 10% 2-merkptoethanol; 0,004% bromfenolová modř).

Jako vzorek negativní kontroly byla použita směs o finálním objemu 100 μ l obsahující 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M AfGcHK a 10 μ M RR protein, ke které bylo po 1 minutě inkubace při 20 °C přidáno 100 μ l 2 x koncentrovaného vzorkového redukujícího pufru.

Vzorky byly analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE-Phos-tag (za použití 10% separačního gelu obsahujícího 75 μ M Phos-tag a 200 μ M chlorid manganatý).

3.3.13.2 Separace P-AfGcHK od nefosforylované formy AfGcHK pomocí iontové výměnné chromatografie

Byl vytvořen premix, obsahující 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý a 10 μ M AfGcHK. Premix byl preinkubován 5 minut při laboratorní teplotě. Reakce byla zahájena přidáním ATP o výsledné koncentraci 1 mM. Tato směs byla inkubována 20 minut při 20 °C. Po inkubaci byly ze směsi odstraněny nežádoucí složky, které by mohly ovlivnit následnou separaci (především ATP a ADP) a to pomocí gelové filtrační chromatografie. Vzorek byl proto podroben gelové filtrační chromatografii s využitím ÄKTAprime plus systému pro kapalinovou chromatografii. Pro tuto separaci byla použita HiTrap Desalting (Sephadex G25 superfine) kolona (GE, Healthcare). Kolona byla ekvilibrována 20 ml pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl pH 8,0. Poté byl na kolonu aplikován vzorek (100 μ l) rychlostí 0,5 ml.min⁻¹. Na základě hodnot absorbance při vlnové délce 280 nm byly jímány frakce, které s největší pravděpodobností obsahovaly fosforylovanou a nefosforylovanou formu AfGcHK. Tyto frakce byly následně podrobeny přesnějšímu spektrofotometrickému stanovení (Cary 60 UV-Vis, Agilent). Bylo měřeno spektrum v rozsahu 200 – 800 nm. Pro další separační postup byly použity pouze frakce, které vykazovaly hodnoty absorbance při vlnových délkách 280 nm a 412 nm (oblast Soretova pásu [110]) a zároveň u nich nedocházelo k absorpci v oblasti 259 nm (v

této oblasti dochází k silné absorpci nukleotidů ATP, respektive ADP [129]). Tyto frakce byly spojeny a přeneseny do zkumavky s membránou, která zadrží proteiny s molekulovou hmotností větší než 30 kDa, tzv. „cut off“ 30 kDa a centrifugovány při 4 °C a 4 500 RPM (Allegro X-22R, Beckman Coulter) do doby, než byl objem směsi přibližně 150 µl. Poté byla provedena separace P-AfGcHK a AfGcHK. Obě formy se od sebe liší svými izoelektrickými body - pI P-AfGcHK je přibližně 6,2, pI AfGcHK je přibližně 6,1 [130]. V pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl pH 8,0 mají tyto formy záporný náboj. Při iontové výměnné chromatografii bylo proto k zachycení těchto forem nutné použít silný anex. Iontově výměnná chromatografie byla provedena pomocí ÄKTAprime plus systému pro kapalinovou chromatografii s použitím HiTrap QXL Sepharose kolony (GE, Healthcare). Kolona byla ekvilibrována 20 ml pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl pH 8,0. Poté byl na kolonu aplikován vzorek (150 µl) rychlostí 2,0 ml.min⁻¹. Pro eluci P-AfGcHK a AfGcHK byl použit lineární gradient z 0 % 20 mM Tris-HCl pH 8,0 do 75 % roztoku 20 mM Tris-HCl, 0,5 M chloridu draselného, pH 8,0 po dobu 10 minut. Byly jímány frakce, které absorbovaly při vlnové délce 280 nm. Tyto frakce byly poté analyzovány pomocí spektrofotometrického měření v rozsahu 200 – 800 nm (Cary 60 UV-Vis, Agilent). Pro další experimenty byly použity pouze frakce, které vykazovaly hodnoty absorbance při vlnových délkách 280 nm a 412 nm. Tyto frakce byly přeneseny do zkumavky s membránou, která zadrží proteiny s molekulovou hmotností větší než 30 kDa, tzv. „cut off“ 30 kDa a centrifugovány při 4 °C a 4 500 RPM (Allegro X-22R, Beckman Coulter) do doby, než byl objem směsi přibližně 200 µl. Byla stanovena koncentrace proteinu ve vzorku metodou využívající kyselinu bicinchoninovou (viz kapitola 3.3.8, strana 47). Pro ověření úspěšnosti separace AfGcHK a P-AfGcHK, byla provedena SDS-PAGE-Phos-tag. Ke vzorku byl přidán 4 x koncentrovaný vzorkový redukující pufr (0,25 M Tris-HCl, pH 6,8; 8% SDS; 40% glycerol; 20% 2-merkптоethanol; 0,008% bromfenolová modř). Byl použit 10% separační gel obsahující 75 µM Phos-tag a 200 µM chlorid manganatý.

3.3.13.3 Odstranění nukleotidů (ATP, ADP) ze směsi P-AfGcHK, AfGcHK pomocí gelové filtrační chromatografie

Nejprve bylo nutné nabohatit P-AfGcHK v inkubační směsi. Byl proto vytvořen premix obsahující 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 µl AfGcHK. Premix byl preinkubován 5 minut při laboratorní teplotě. Reakce byla zahájena přidávkem ATP o výsledné koncentraci 1 mM. Tato směs byla

inkubována 90 minut při 20 °C. Pro odstranění nukleotidů (ATP, ADP) a hořečnatých kationtů, které byly pro další experimenty nežádoucí, byla použita gelová filtrační chromatografie s využitím ÄKTAprime plus systému pro kapalinovou chromatografii a HiTrap Desalting (Sephadex G25 superfine) kolony (GE, Healthcare). Kolona byla ekvilibrována 20 ml pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl, pH 8,0. Poté byl na kolonu aplikován vzorek (180 μ l) rychlostí 0,5 ml.min⁻¹. Na základě hodnot absorbance při vlnové délce 280 nm byly jímány frakce, které s největší pravděpodobností obsahovaly fosforylovanou a nefosforylovanou formu *AfGcHK*. Tyto frakce byly následně podrobeny přesnějšímu spektrofotometrickému stanovení (Cary 60 UV-Vis, Agilent). Bylo měřeno spektrum v rozsahu 200 – 800 nm. U vzorků, které vykazovaly hodnoty absorbance při vlnových délkách 280 nm a 412 nm a zároveň u nich nedocházelo k absorpci v oblasti 259 nm byla stanovena koncentrace proteinu metodou využívající kyselinu bicinchoninovou (viz kapitola 3.3.8, strana 47). Tyto vzorky byly použity k reakcím popsaným v následujících kapitolách.

3.3.13.4 Popis vlastností RR proteinu a mechanismu participace RR proteinu na své fosforylaci

Pro studium působení hořečnatých, respektive vápenatých kationtů na *P-AfGcHK* v přítomnosti RR proteinu byla vytvořena směs, která byla rozdělena do jednotlivých alikvotů. Složení každého alikvotu o finálním objemu 100 μ l bylo následující: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, respektive 5 mM chlorid vápenatý, 10 μ M směs *AfGcHK* a *P-AfGcHK* prostá nukleotidů a hořečnatých kationtů a 10 μ M RR protein. Alikvoty byly inkubovány 5 minut a 30 minut při 20 °C.

Byl studován také vliv koncentrace hořečnatých kationtů (2,5 mM, 10,0 mM) na *P-AfGcHK* v přítomnosti RR proteinu. Pro výslednou koncentraci hořečnatých kationtů v reakční směsi 2,5 mM byl vytvořen premix o výsledném objemu 100 μ l obsahující 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 2,5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M směs *AfGcHK* a *P-AfGcHK* prostou nukleotidů a hořečnatých kationtů a 10 μ M RR protein. Pro výslednou koncentraci hořečnatých kationtů v reakční směsi 10 mM byl vytvořen premix o výsledném objemu 100 μ l obsahující 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 10 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M směs *AfGcHK* a *P-AfGcHK* prostou nukleotidů a hořečnatých kationtů a 10 μ M RR protein. Směsi byly inkubovány 5 minut při 20 °C.

Byla vytvořena také směs bez dvojmocných kationtů, která byla rozdělena do alikvotů. Složení každého alikvotu o finálním objemu 100 μ l bylo následující: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 10 μ M směs AfGcHK a P-AfGcHK prostá nukleotidů a hořečnatých kationtů a 10 μ M RR protein. Tyto alikvoty byly inkubovány 5 minut a 30 minut.

Byla vytvořena reakční směs o finálním objemu 100 μ l obsahující 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M směs AfGcHK a P-AfGcHK prostou nukleotidů a hořečnatých kationtů a 5 μ M RR protein. Další reakce byla studována v reakční směsi bez hořečnatých kationtů o finálním objemu 100 μ l obsahující 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 10 μ M směs AfGcHK a P-AfGcHK prostou nukleotidů a hořečnatých kationtů a 5 μ M RR protein. Obě reakční směsi byly inkubovány 30 minut při 20 °C.

Byl zkoumán také vliv ATP, respektive ATP^A na studovanou fosfotransferovou reakci. Byla vytvořena reakční směs o finálním objemu 100 μ l obsahující 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M směs AfGcHK a P-AfGcHK prostou nukleotidů a hořečnatých kationtů, 10 μ M RR protein a 1 mM ATP, respektive ATP^A. Tyto směsi byly inkubovány 5 minut při 20 °C. Byla vytvořena také reakční směs bez hořečnatých kationtů. Byl vytvořen premix, který byl rozdělen do alikvotů. Složení každého alikvotu o finálním objemu 100 μ l bylo následující: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 10 μ M směs AfGcHK a P-AfGcHK prostá nukleotidů a hořečnatých kationtů, 10 μ M RR protein a 1 mM ATP, respektive 1 mM ATP^A. Tyto alikvoty byly inkubovány 1 minutu a 5 minut při 20 °C.

Pro vzorek pozitivní kontroly byla vytvořena směs o finálním objemu 100 μ l obsahující 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M AfGcHK, 10 μ M RR protein a 1 mM ATP. Tato směs byla inkubována 1 minutu při 20 °C.

Pro vzorek negativní kontroly byla vytvořena směs o finálním objemu 100 μ l obsahující 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M AfGcHK a 10 μ M RR protein. Tato směs byla inkubována 10 minut při 20 °C.

Po uplynutí inkubační doby bylo ke směsím přidáno 100 μ l 2 x koncentrovaného redukujícího pufru (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 10% 2-merkptoethanol; 0,004% bromfenolová modř). Vzorky byly analyzovány prostřednictvím

SDS-PAGE-Phos-tag (za použití 10% separačního gelu obsahujícího 75 μ M Phos-tag a 200 μ M chlorid manganatý).

3.3.14 Studium využití donorů fosfátu (jiných než P-AfGCHK) jako substrátů pro fosfotransfer na RR protein

3.3.14.1 Studium vlivu fosfoenolpyruvátu na fosforylační proces RR proteinu

Byl připraven premix, který byl rozdělen do jednotlivých alikvotů. Složení každého alikvotu o finálním objemu 100 μ l bylo následující: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý a 10 μ M RR protein. Tyto alikvoty byly preinkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Poté byly reakce zahájeny přidavkem fosfoenolpyruvátu o výsledné koncentraci 1 mM. Byly testovány různé inkubační časy této reakční směsi – 30 s, 1 min, 5 min, 10 min, 30 min, 60 min. Reakce byly ukončeny přidavkem 100 μ l 2 x koncentrovaného vzorkového redukujícího pufru (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 10% 2-merkaptoethanol; 0,004% bromfenolová modř). Vzorky byly analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE-Phos-tag (za použití 10% separačního gelu obsahujícího 75 μ M Phos-tag a 200 μ M chlorid manganatý).

3.3.14.2 Studium vlivu acetylfosfátu na fosforylační proces RR proteinu

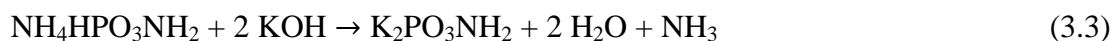
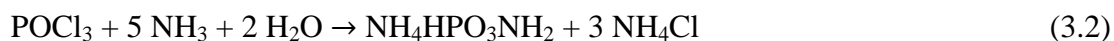
Fosfotransferová reakce byla studována v premixu, který byl rozdělen do jednotlivých alikvotů. Složení každého alikvotu o finálním objemu 100 μ l bylo následující: 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M RR protein a pufr o příslušném pH. Pro pH prostředí 8,0 byl použit 100 mM Tris-HCl pufr, pro pH prostředí 6,0 byl použit fosfátový pufr (100 mM hydrogenfosforečnan sodný, 100 mM dihydrogenfosforečnan sodný). Tyto alikvoty byly preinkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Reakce byly zahájeny přidavkem acetylfosfátu o výsledné koncentraci 1 mM. Byly testovány různé inkubační časy reakčních směsí – 1 min, 5 min, 30 min, 60 min, 180 min při teplotě 20 °C.

Byl studován také vliv acetylfosfátu v přítomnosti ATP na fosfotransfer na RR protein. Pro tento experiment byl připraven premix, který byl rozdělen do alikvotů. Složení každého alikvotu o finálním objemu 100 μ l bylo následující: 100 mM fosfátový pufr, pH 6,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý a 10 μ M RR protein. Tyto alikvoty byly preinkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Reakce byly zahájeny přidavkem acetylfosfátu o výsledné koncentraci 1 mM a ATP o výsledné koncentraci 1 mM. Byly testovány různé inkubační časy reakčních směsí – 1 min, 60 min, 180 min. Inkubace probíhala při teplotě 20 °C.

Reakce byly ukončeny přidavkem 100 μl 2 x koncentrovaného vzorkového redukujícího pufru (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 10% 2-merkapt ethanol; 0,004% bromfenolová modř). Vzorky byly analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE-Phos-tag (za použití 10% separačního gelu obsahujícího 75 μM Phos-tag a 200 μM chlorid manganatý).

3.3.14.3 Příprava fosforamidátu

Pro přípravu fosforamidátu byla použita klasická Stokesova metoda [131]. Nejprve byla syntetizována amonná sůl fosforamidátu (3.2), která byla poté převedena na draselnou sůl fosforamidátu (3.3), (3.4).



9,2 ml fosforylchloridu bylo po kapkách a za stálého míchání přidáno k 150 ml ledově vychlazenému 10% vodnému roztoku amoniaku. Vzniklý čirý roztok byl míchán po dobu 15 minut a poté k němu bylo přidáno 500 ml acetonu. Tím došlo k vytvoření dvou vrstev – vodné, která obsahovala fosforamidát a acetonové, ve které byly obsaženy ostatní amidofosfáty ($\text{NH}_4\text{PO}_2(\text{NH}_2)_2$, $\text{PO}(\text{NH}_2)_3$) [131]. Byla proto odebrána spodní vodná vrstva, ke které byly přidány přibližně 4 ml ledové kyseliny octové tak, aby bylo dosaženo pH 6. Pro zahájení krystalizace fosforamidátu byla směs ochlazená na 5 °C. Tento meziprodukt byl filtrován, poté postupně promýván ethanolem a etherem a vysušen. Pro odstranění amoniaku byla získaná amonná sůl fosforamidátu rozpuštěna v 10 ml 50% roztoku hydroxidu draselného a zahřána na 60 °C po dobu 10 minut. Poté byl roztok ochlazen na 5 °C a pomocí ledové kyseliny octové bylo upraveno pH na hodnotu 6. Následně byla směs promyta 500 ml ethanolu, filtrována, promyta ethanolem a etherem a vysušena.

3.3.14.4 Studium vlivu fosforamidátu na fosforylační proces RR proteinu

Fosfotransferová reakce byla studována v premixu o finálním objemu 100 μl , obsahujícím 50 mM chlorid draselný, 50 mM chlorid hořečnatý, 10 μM RR protein a fosfátový pufr (100 mM hydrogenfosforečnan sodný, 100 mM dihydrogenfosforečnan sodný), pH 7,0. Tato směs byla preinkubována 5 minut při laboratorní teplotě. Reakce byla

zahájena přidavkem fosforamidátu o výsledné koncentraci 100 mM. Reakční směs byla inkubována 180 minut při teplotě 20 °C.

Pro studium vlivu inkubační doby na fosforylaci RR proteinu byl vytvořen premix, který byl rozdělen do jednotlivých alikvotů. Složení každého alikvotu o finálním objemu 100 µl bylo následující: 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 µM RR protein a 100 mM fosfátový pufr, pH 7,0. Tyto alikvoty byly preinkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Reakce byly zahájeny přidavkem fosforamidátu o výsledné koncentraci 20 mM. Reakční směsi byly inkubovány 60 min, 180 min, 900 min a 1320 min při teplotě 20 °C.

Byl vytvořen premix, který byl rozdělen do jednotlivých alikvotů. Složení každého alikvotu o finálním objemu 100 µl bylo následující: 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 µM RR protein a 100 mM fosfátový pufr, pH 7,0. Tyto alikvoty byly preinkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Reakce byly zahájeny přidavkem fosforamidátu o výsledné koncentraci 100 mM a přidavkem ATP o výsledné koncentraci 1 mM. Reakční směsi byly inkubovány 1 minutu a 180 minut při teplotě 20 °C.

Byla studována také závislost fosforylace RR proteinu na koncentraci fosforamidátu. Tato závislost byla měřena v premixu, který byl rozdělen do jednotlivých alikvotů. Složení každého alikvotu o finálním objemu 100 µl bylo následující: 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 µM RR protein a 100 mM fosfátový pufr, pH 7,0. Alikvoty byly preinkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Reakce byly zahájeny přidavkem fosforamidátu o různých finálních koncentracích 10 mM, 20 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM, 125 mM, 150 mM a 160 mM. Reakce byly inkubovány 180 minut a 315 minut při 20 °C.

Během experimentu, kdy byla studována závislost fosforylace RR proteinu na koncentraci hořečnatých kationtů ve směsi, byl vytvořen premix, který byl rozdělen do jednotlivých alikvotů. Složení každého alikvotu o finálním objemu 100 µl bylo následující: 100 mM fosfátový pufr, pH 7,0, 50 mM chlorid draselný, 10 µM RR protein a chlorid hořečnatý o dané výsledné koncentraci 10 mM, 50 mM, 100 mM, 125 mM a 160 mM. Tyto alikvoty byly preinkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Reakce byly zahájeny přidavkem fosforamidátu o výsledné koncentraci 160 mM. Reakční směsi byly inkubovány 180 minut při 20 °C.

Pro vzorek pozitivní kontroly byla vytvořena směs o finálním objemu 100 µl obsahující 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10

μM AfGcHK, $10 \mu\text{M}$ RR protein a 1 mM ATP. Tato směs byla inkubována 30 minut při 20°C .

Pro vzorek negativní kontroly byla vytvořena směs o finálním objemu $100 \mu\text{l}$ obsahující 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý a $10 \mu\text{M}$ RR protein.

Všechny výše uvedené reakce byly ukončeny přidavkem $100 \mu\text{l}$ 2 x koncentrovaného vzorkového redukujícího pufru ($0,125 \text{ M}$ Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 10% 2-merkptoethanol; 0,004% bromfenolová modř). Vzorky byly analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE-Phos-tag (za použití 10% separačního gelu obsahujícího $75 \mu\text{M}$ Phos-tag a $200 \mu\text{M}$ chlorid manganatý).

3.3.14.5 Studium vlivu ATP na fosforylační proces RR proteinu

Byl připraven premix, který byl rozdělen do jednotlivých alikvotů. Složení každého alikvotu o finálním objemu $100 \mu\text{l}$ bylo následující: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, $10 \mu\text{M}$ RR protein. Tyto alikvoty byly preinkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Reakce byly zahájeny přidavkem ATP o výsledné koncentraci 1 mM . Reakční směsi byly inkubovány 30 minut a 60 minut při 20°C . Reakce byly ukončeny přidavkem $100 \mu\text{l}$ 2 x koncentrovaného vzorkového redukujícího pufru ($0,125 \text{ M}$ Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 10% 2-merkptoethanol; 0,004% bromfenolová modř). Vzorky byly analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE-Phos-tag elektroforesy (za použití 10% separačního gelu obsahujícího $75 \mu\text{M}$ Phos-tag a $200 \mu\text{M}$ chlorid manganatý).

3.3.14.6 Studium vlivu nehydrolyzovatelného analogu ATP - adenosin 5'-(β,γ -imido)trifosfátu (ATP^A) na fosforylační proces RR proteinu

Byl připraven reakční premix, který byl rozdělen do jednotlivých alikvotů. Složení každého alikvotu o finálním objemu $100 \mu\text{l}$ bylo následující: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, $10 \mu\text{M}$ RR protein. Tyto alikvoty byly preinkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Reakce byly zahájeny přidavkem ATP^A o výsledné koncentraci 1 mM . Reakční směsi byly inkubovány 5 minut a 30 minut při 20°C . Reakce byly ukončeny přidavkem $100 \mu\text{l}$ 2 x koncentrovaného vzorkového redukujícího pufru ($0,125 \text{ M}$ Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 10% 2-merkptoethanol; 0,004% bromfenolová modř). Vzorky byly analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE-

Phos-tag elektroforezy (za použití 10% separačního gelu obsahujícího 75 μM Phos-tag a 200 μM chlorid manganatý).

3.3.15 Stanovení kinetických parametrů enzymové reakce AfGcHK

3.3.15.1 Studium závislosti autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP

Autofosforylační aktivita AfGcHK byla měřena v premixu, který byl rozdělen do jednotlivých alikvotů. Složení každého alikvotu o finálním objemu 100 μl bylo následující: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý a 10 μM AfGcHK. Alikvoty byly preinkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Reakce byly zahájeny přidáním ATP o různých finálních koncentracích 0 μM (byl přidán 50 mM Tris-HCl), 5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM , 250 μM , 300 μM , 400 μM , 500 μM , 600 μM , 800 μM , 1000 μM , 2000 μM . Reakce byly ukončeny po 30 sekundách přidávkem 100 μl 2 x koncentrovaného vzorkového redukujícího pufru (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 10% 2-merkptoethanol; 0,004% bromfenolová modř). Vzorky byly analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE-Phos-tag (za použití 10% separačního gelu obsahujícího 75 μM Phos-tag a 200 μM chlorid manganatý).

3.3.15.2 Studium závislosti autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP v nepřítomnosti hořečnatých kationtů

Autofosforylační aktivita AfGcHK byla měřena v premixu, který byl rozdělen do jednotlivých alikvotů. Složení každého alikvotu o finálním objemu 100 μl bylo následující: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný a 10 μM AfGcHK. Alikvoty byly preinkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Reakce byly zahájeny přidáním ATP o různých finálních koncentracích 0 μM (byl přidán 50 mM Tris-HCl), 5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM , 300 μM , 400 μM , 500 μM , 750 μM , 1000 μM , 2000 μM . Reakce byly ukončeny po 60 sekundách přidávkem 100 μl 2 x koncentrovaného vzorkového redukujícího pufru (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 10% 2-merkptoethanol; 0,004% bromfenolová modř). Vzorky byly analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE-Phos-tag (za použití 10% separačního gelu obsahujícího 75 μM Phos-tag a 200 μM chlorid manganatý).

3.3.15.3 Studium závislosti autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP v přítomnosti RR proteinu a v nepřítomnosti hořečnatých kationtů

Autofosforylační aktivita AfGcHK byla měřena v premixu, který byl rozdělen do jednotlivých alikvotů. Složení každého alikvotu o finálním objemu 100 μ l bylo následující: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 10 μ M AfGcHK a 10 μ M RR protein. Alikvoty byly preinkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Reakce byly zahájeny přidáním ATP o různých finálních koncentracích 0 μ M (byl přidán 50 mM Tris-HCl), 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M, 300 μ M, 400 μ M, 500 μ M, 750 μ M, 1000 μ M, 2000 μ M. Reakce byly ukončeny po 60 sekundách přidávkem 100 μ l 2 x koncentrovaného vzorkového redukujícího pufru (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 10% 2-merkaptoethanol; 0,004% bromfenolová modř). Vzorky byly analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE-Phos-tag (za použití 10% separačního gelu obsahujícího 75 μ M Phos-tag a 200 μ M chlorid manganatý).

3.3.16 Studium závislosti autofosforylace AfGcHK v přítomnosti hořečnatých kationtů a v přítomnosti RR proteinu

Autofosforylační reakce byla studována v premixu, který byl rozdělen do jednotlivých alikvotů. Složení každého alikvotu o finálním objemu 100 μ l bylo následující: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M AfGcHK a 10 μ M RR protein. Alikvoty byly preinkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Reakce byly zahájeny přidáním ATP o různých finálních koncentracích 0 μ M (byl přidán 50 mM Tris-HCl), 10 μ M, 100 μ M, 250 μ M, 500 μ M, 1000 μ M. Reakce byly ukončeny po 1 minutě přidávkem 100 μ l 2 x koncentrovaného vzorkového redukujícího pufru (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 10% 2-merkaptoethanol; 0,004% bromfenolová modř). Vzorky byly analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE-Phos-tag (za použití 10% separačního gelu obsahujícího 75 μ M Phos-tag a 200 μ M chlorid manganatý).

3.3.17 Určení kinetických parametrů

Metoda SDS-PAGE-Phos-tag (viz kapitola 3.3.10, strana 48) byla v případě potřeby následována určením kinetických parametrů studovaných enzymových reakcí. Odbarvené separační gely byly naskenovány (Scanjet G3010, HP) a převedeny tak do elektronické formy. Intenzita pruhů fosforylované a nefosforylované formy proteinů byla vyhodnocena pomocí programu ImageJ. Byly odečteny plochy píků a součet P-AfGcHK a

A/GcHK byl považován za 100 %. Z této úvahy byla kalkulována všechna vyhodnocení. Z následujících vztahů byly vypočteny příslušné veličiny

$$\text{Procento fosforylace: } \frac{I(F)}{I(F)+I(N)} \quad (3.5)$$

$$\text{Hmotnost fosforylované formy proteinu: } m = \frac{I(F) \cdot m(j)}{I(F)+I(N)} \quad (3.6)$$

$$\text{Látkové množství fosforylované formy proteinu: } n = \frac{m}{M_m} \quad (3.7)$$

kde I(F) je intenzita fosforylované formy proteinu, I(N) intenzita nefosforylované formy proteinu, m(j) hmotnost proteinu (fosforylovaná i nefosforylovaná forma) v jedné jamce, a M_m je molární hmotnost proteinu.

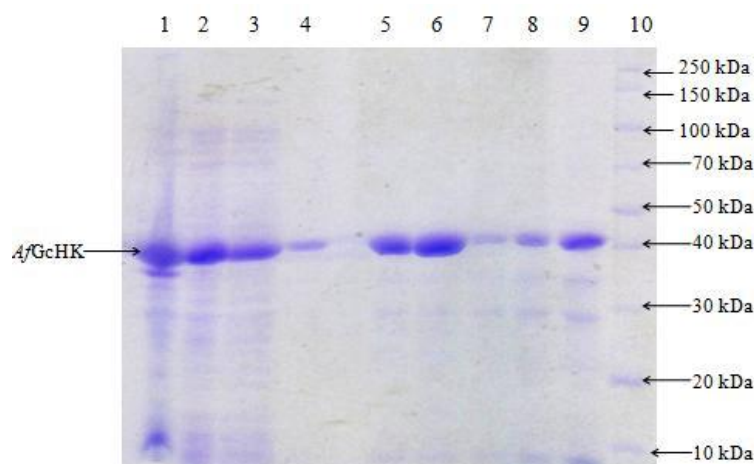
Počáteční rychlost reakce byla získána jako látkové množství fosforylované formy proteinu vzniklé za jednotku času v jednotce objemu reakční směsi.

Pro určení kinetických parametrů byl sestaven dvojnásobně reciproký graf závislosti počáteční rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu [132]. Ze získané regresní rovnice byla vypočítána hodnota K_m a V_{max}.

4 Výsledky

4.1 Optimalizace protokolu heterologní exprese a izolačního postupu AfGcHK za účelem maximální saturace AfGcHK hemem (příprava plné holoformy AfGcHK)

Z výsledků spektrofotometrické analýzy hemoproteinu AfGcHK exprimovaného a izolovaného v rámci zpracování bakalářské práce vyplynulo, že byla při aplikaci klasického protokolu exprese a izolace získána pouze tři procenta holoformy AfGcHK [133]. Za účelem saturace AfGcHK hemem byly navrženy tři nové protokoly exprese proteinu AfGcHK v buňkách *E. coli* BL-21(DE3). AfGcHK byl exprimován při různých koncentracích δ -ALA v TB mediu (viz kapitola 3.3.3.2, strana 43) a to 0,0 mM (protokol A), 0,5 mM (protokol B) a 1,0 mM (protokol C). K AfGcHK, který byl exprimován bez přídavku δ -ALA (protokol A), byl během izolačního postupu přidán hemim rozpuštěný v dimethylsulfoxidu o výsledné koncentraci 750 μ M (viz kapitola 3.3.4, strana 43). Při použití protokolů B a C nebyl v průběhu izolace přidán hemin (viz kapitola 3.3.4, strana 43.3.4 Izolace proteinu AfGcHK z buněk *E. coli* BL-21(DE3)). Aby bylo možné sledovat efektivitu jednotlivých kroků izolačního postupu, byly během izolace odebírány vzorky, které byly následně analyzovány metodou SDS-PAGE (viz kapitola 3.3.9, strana 47). Na obrázku 16, strana 66 je zobrazena výsledná analýza vzorků získaných použitím protokolu A. Na základě aminokyselinové sekvence AfGcHK byla vypočtena jeho teoretická molární hmotnost. Její hodnota je 43 kDa. Mobilita finálního preparátu AfGcHK (dráha 9, obrázek 16, strana 66) je srovnatelná s mobilitou standardu s molární hmotností 40 kDa (dráha 10, obrázek 16, strana 66). Je proto velmi pravděpodobné, že izolace proteinu AfGcHK z buněk *E. coli* BL-21(DE3) proběhla úspěšně. Z této SDS-PAGE dále vyplývá, že většina balastních proteinů byla od izolovaného AfGcHK oddělena v procesu afinitní chromatografie (dráha 3, obrázek 16, strana 66). Homogenita výsledného preparátu izolovaného AfGcHK tak byla více než 95%. Analogické výsledky byly získány i při izolaci AfGcHK za použití protokolů B a C.



Obrázek 16: SDS-PAGE vzorků odebíraných v průběhu izolace AfGcHK

V jednotlivých drahách jsou naneseny následující vzorky:

- 1: Vzorek partikulární frakce po ultracentrifugaci
- 2: Vzorek cytosolární frakce po ultracentrifugaci
- 3: Vzorek cytosolární frakce, nevázané na afinitní gel (TALON)
- 4: Vzorek eluovaný z afinitního gelu 10 mM roztokem imidazolu
- 5: Vzorek eluovaný z afinitního gelu 20 mM roztokem imidazolu
- 6: Vzorek eluovaný z afinitního gelu 200 mM roztokem imidazolu
- 7: Zakoncentrovaný vzorek (eluovaný 10 mM roztokem imidazolu)
- 8: Zakoncentrovaný vzorek (eluovaný 20 mM roztokem imidazolu)
- 9: Zakoncentrovaný vzorek (eluovaný 200 mM roztokem imidazolu)
- 10: Marker – Page RulerTM Broad Range Unstained Protein Ladder

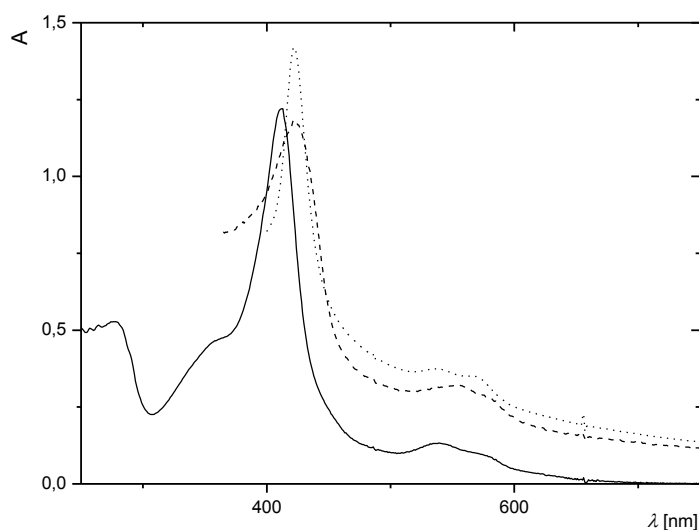
Finální preparáty izolovaných proteinů (exprimovaných dle protokolů A, B a C eluované 200 mM imidazolem) byly podrobeny charakterizaci. Koncentrace proteinu ve vzorcích byla určena metodou využívající přítomnost bicinchoninové kyseliny v reakčním činidle (viz kapitola 3.3.8, strana 47), koncentrace hemu ve vzorcích byla stanovena pomocí pyridin-hemochromové metody (viz kapitola 3.3.6, strana 46). Výsledky z těchto stanovení jsou zaznamenány v tabulce 2, strana 67. Pokud byl protein AfGcHK exprimován spolu s δ -ALA (protokol A, respektive protokol B), byla získána pouze minimální část proteinu ve formě holoproteinu (2,88 %, respektive 0,11 %). Během experimentu, kdy byl protein exprimován bez přídavku δ -ALA (protokol C) a následně rekonstituován 750 μ M heminem byl výtěžek holofomy 117 %.

Aby bylo potvrzeno, že holofорма AfGcHK má správně koordinovaný hem ve své struktuře, bylo měřeno spektrum vzorku v rozsahu 250 – 750 nm. Další spektrum bylo

zaznamenáno po redukci dithioničtanem sodným a bylo měřeno také spektrum redukovaného preparátu vystaveného působení oxidu uhelnatého po dobu 5 minut. Bylo zjištěno, že Soretův pás holoforního komplexu hemu s iontem železa ve stavu [Fe(III)] *AfGCHK* se vyskytuje v oblasti 413 nm (plná křivka, obrázek 17, strana 68), poloha Soretova pásu proteinu s redukovanou formou hemu komplexu hemu s iontem železa ve formě [Fe(II)] je 422 nm (čárkovaná křivka, obrázek 17, strana 68) a charakteristická vlnová délka Soretova pásu komplexu hemu v interakci s oxidem uhelnatým [Fe(II)CO] je 422 nm (tečkovaná křivka, obrázek 17, strana 68). Tato data jsou v pozitivní korelaci s pilotní publikací, kde byl protein *AfGCHK* studován [110] a lze proto říci, že hem je k proteinu *AfGCHK* koordinován analogicky jako v této studii tj. koordinací iontu železa k proximálnímu histidinu.

Tabulka 2: Výsledky primární charakterizace jednotlivých izolovaných proteinů *AfGCHK*

Protokol	A	B	C
Koncentrace δ-ALA během exprese [mM]	0,50	1,00	0,00
Koncentrace přidaného heminu [μM]	0,00	0,00	750,00
Koncentrace hemu v proteinovém finálním preparátu [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$]	1,89	0,03	52,03
Celková koncentrace proteinu ve finálním preparátu (získaného z cca 6 g bakteriální kultury) [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$]	65,60	27,50	44,66
Obsah holoforní [%]	2,88	0,11	117,00
Rz poměr získaný UV-VIS spektrální analýzou A(413)/A(280)	0,01	0,02	2,30

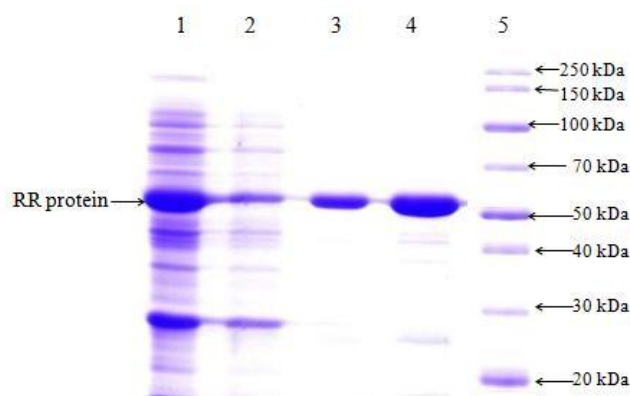


Obrázek 17: Spektrální analýza finálního preparátu AfGcHK (exprimovaný bez přídavku δ -ALA, rekonstituovaný 750 μ M heminem)

Vzorek finálního preparátu [Fe(III)] (plná křivka), vzorek po redukci dithionitátem sodným [Fe(II)] (čárkovaná křivka), redukovaný preparát vystavený působení oxidu uhelnatého [Fe(II)CO] (tečkovaná křivka).

4.2 Izolace RR proteinu z buněk *E.coli* BL-21(DE3)

Byla provedena izolace RR proteinu. Postup této izolace je uveden v kapitole 3.3.5, strana 45. Aby bylo možné sledovat efektivitu jednotlivých kroků izolačního postupu, byly během izolace odebírány vzorky, které byly následně analyzovány metodou SDS-PAGE. Teoretická molární hmotnost RR proteinu s připojeným GST (proteinová kotva pro afinitní chromatografii), byla určena na základě aminokyselinové sekvence těchto proteinů. Její hodnota je 52 kDa. Mobilita finálního zakoncentrovaného preparátu RR proteinu (dráha 4, obrázek 18, strana 69) je srovnatelná s mobilitou standardu s molární hmotností 50 kDa (dráha 5, obrázek 18, strana 69). Lze proto předpokládat, že izolace RR proteinu z buněk *E. coli* BL-21(DE3) proběhla úspěšně. Majoritní část balastních proteinů byla od izolovaného RR proteinu oddělena procesem afinitní chromatografie (dráha 2, obrázek 18, strana 69). RR protein tak byl získán ve více než 95% homogenitě.



Obrázek 18: SDS-PAGE vzorků odebíraných v průběhu izolace RR proteinu

V jednotlivých drahách jsou naneseny následující vzorky:

- 1: Vzorek cytosolární frakce po ultracentrifugaci
- 2: Vzorek cytosolární frakce, nevázané na afinitní gel (*Glutathione Sepharose 4B*)
- 3: Vzorek eluovaný z afinitního gelu 10 mM roztokem glutathionu
- 4: Zakoncentrovaný vzorek eluovaný 10 mM roztokem glutathionu
- 5: Marker – *Page Ruler™ Broad Range Unstained Protein Ladder*

4.3 Optimalizace metody SDS-PAGE-Phos-tag pro studium enzymových reakcí

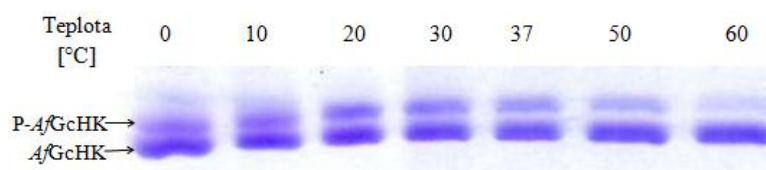
Před tím, než bylo možné studovat enzymové reakce *AfGcHK* a RR proteinu pomocí SDS-PAGE-Phos-tag, bylo nezbytně nutné tuto metodu optimalizovat. Nejprve bylo třeba najít optimální procentuální zastoupení akrylamidu v separačním gelu obsahující Phos-tag. Při použití 12% separačního gelu nedocházelo k dostatečnému rozdělení fosforylované a nefosforylované formy proteinů. Pokud byl použit 8% separační gel, docházelo k rozsáhlejšímu rozmývání proteinových zón difúzí, což značně ztěžovalo vyhodnocení intenzity jednotlivých proteinových frakcí (data nejsou ukázána). Pro další experimenty byl proto používán 10% separační gel. Dále bylo nutné optimalizovat množství analyzovaných proteinů pomocí SDS-PAGE-Phos-tag. Bylo zjištěno, že při analýze více než 0,6 μg proteinu dochází k nedostatečnému rozdělení jednotlivých zón (data nejsou ukázána). Z tohoto důvodu bylo vždy analyzováno maximálně 0,6 μg proteinu, ve většině případů 0,5 μg proteinu. Dále bylo nezbytné určit, jaké je optimální množství Phos-tagu, přidaného do směsi tvořící separační gel. Optimální koncentrace Phos-tagu ve směsi byla 75 μM , popřípadě 100 μM (data nejsou ukázána). Optimální

koncentrace chloridu manganatého ve směsi tvořící separační gel s Phos-tagem byla 200 μM (data nejsou ukázána).

4.4 Optimalizace podmínek pro studium enzymových reakcí proteinu AfGcHK

4.4.1 Teplotní závislost autofosforylace AfGcHK

Vliv teploty na autofosforylaci AfGcHK byl studován v roztocích, jejichž složení a podmínky reakce jsou uvedeny v kapitole 3.3.11.1, strana 50. Reakce byla zahájena přidávkem ATP a probíhala 15 minut při příslušné teplotě (0 °C, 10 °C, 20 °C, 30 °C, 37 °C, 50 °C a 60 °C). Po ukončení reakce byly odebrány vzorky, které byly analyzovány pomocí SDS-PAGE-Phos-tag (kapitola 3.3.10, strana 48). Intenzity pruhů odpovídající P-AfGcHK a AfGcHK (obrázek 19) byly vyhodnoceny pomocí programu ImageJ a bylo spočítáno látkové množství P-AfGcHK, vzniklé během enzymové reakce katalyzované 11,6 pmol (tj. 0,52 μg) AfGcHK při příslušné teplotě (osa y, obrázek 20, strana 71). K nejvyššímu nárůstu látkového množství P-AfGcHK docházelo, pokud inkubace reakční směsi probíhala při teplotách 10 °C a 20 °C, kdy vzniklo přibližně 5 až 6 pmol P-AfGcHK (během 15 minut). Při vyšších inkubačních teplotách (30 °C, 37 °C, 50 °C a 60 °C) a při inkubaci reakční směsi při 0 °C byly autofosforylovány pouze méně než 4 pmol z celkových 11,6 pmol AfGcHK. Optimální teplota pro autofosforylaci AfGcHK se pohybuje v rozmezí 10 °C a 20 °C. Následující experimenty, ve kterých byla měřena autofosforylační aktivita AfGcHK, proto probíhaly při 20 °C.

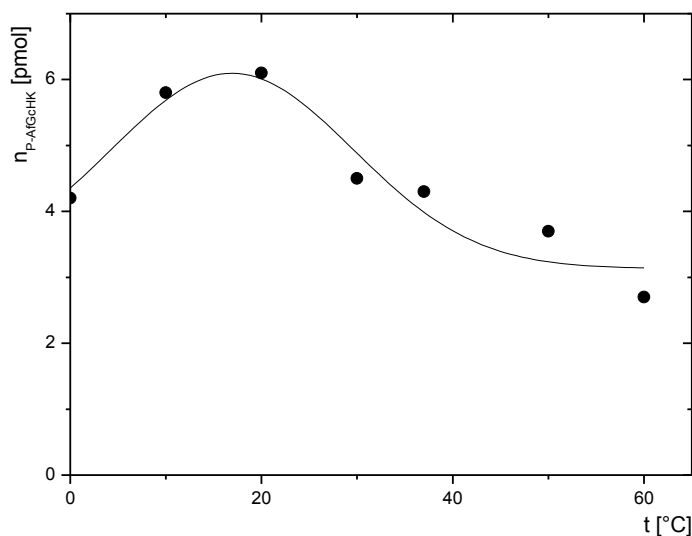


Obrázek 19: Teplotní závislost autofosforylace AfGcHK

Čísla vyjadřují inkubační teplotu dané reakční směsi.

Složení reakční směsi: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μM AfGcHK, 1 mM ATP; inkubace 15 minut.

Pro SDS-PAGE-Phos-tag byl použit 10% separační gel, 50 μM Phos-tag a 200 μM chlorid manganatý.



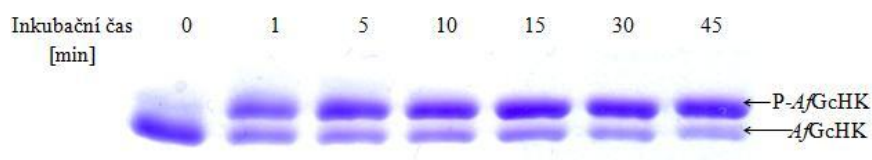
Obrázek 20: Teplotní závislost autofosforylace AfGcHK

Autofosforylační reakce byla zahájena přidavkem ATP při příslušné teplotě (osa x). Po 15 minutách byla reakce ukončena a P-AfGcHK byla od AfGcHK separována pomocí SDS-PAGE-Phos-tag. Z intenzit pruhů bylo vypočítáno látkové množství P-AfGcHK, které vzniklo z 11,6 pmol AfGcHK (osa y).

4.4.2 Časová závislost autofosforylace AfGcHK

Závislost autofosforylace AfGcHK na inkubačním čase reakční směsi byla studována v roztocích, jejichž složení a podmínky reakce jsou popsány v kapitole 3.3.11.2, strana 50. Reakce byla zahájena přidavkem ATP. Inkubační časy reakční směsi byly 0 min, 1 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min a 45 min. Po ukončení reakce byly vzorky analyzovány metodou SDS-PAGE-Phos-tag, kde byl P-AfGcHK separován od AfGcHK (obrázek 21, strana 72). V dráze, kde je nanesen vzorek AfGcHK bez přidaného ATP (dráha 0 min, obrázek 21, strana 72) lze i přes fakt, že ATP nebylo do směsi dodáno, pozorovat stopové množství P-AfGcHK. Znamená to, že přibližně 1,3 pmol z celkových 11,6 pmol AfGcHK bylo izolováno z buněk *E. coli* BL-21 (DE3) ve formě P-AfGcHK nebo, že získaný preparát obsahuje stopy endogenního ATP. Je proto nutné provádět korekci a tuto hodnotu látkového množství odečítat od hodnot látkového množství P-AfGcHK, které vzniklo enzymovou reakcí s dodaným ATP (tyto korigované hodnoty byly vyneseny na osu y, obrázek 22, strana 72). K výrazné autofosforylaci AfGcHK dochází již 1 minutu po zahájení reakce přidáním ATP. Za tuto dobu došlo k nárůstu P-AfGcHK ve směsi přibližně

o 6 pmol. Pokud byla směs AfGcHK s ATP inkubována déle než 1 minutu, vzniklo přibližně 7 až 8 pmol P-AfGcHK. Autofosforylační reakce AfGcHK tak probíhá relativně rychle a již po 5 minutě dochází k nasycení AfGcHK substrátem, tj. ATP (obrázek 22). Během studia kinetických parametrů enzymové reakce AfGcHK bylo proto nutné dodržovat inkubační časy reakční směsi kratší než 1 minutu.

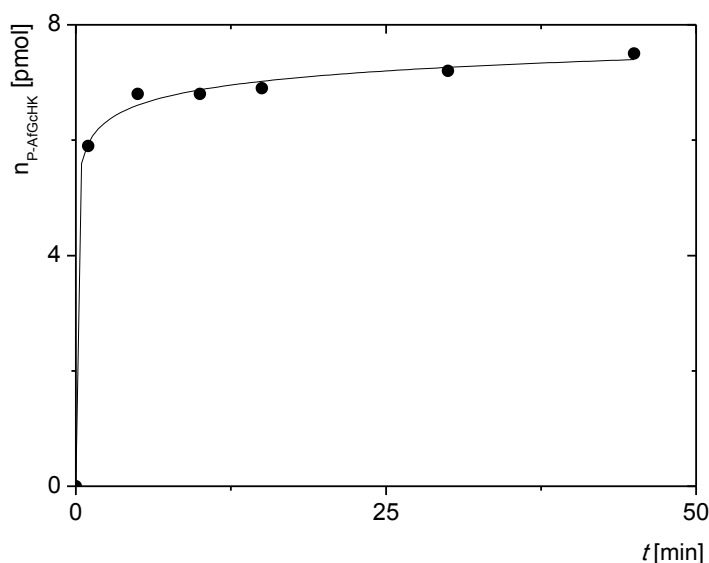


Obrázek 21: Závislost autofosforylace AfGcHK na inkubačním čase

Čísla znázorňují čas, po který probíhala enzymové reakce.

Složení reakční směsi: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M AfGcHK, 1 mM ATP.

Pro SDS-PAGE-Phos-tag byl použit 10% separační gel, 75 μ M Phos-tag a 200 μ M chlorid manganatý.

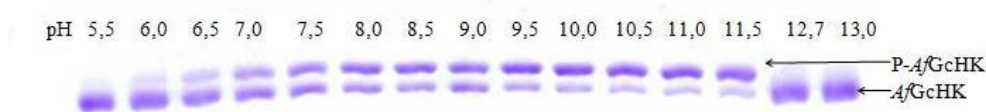


Obrázek 22: Závislost autofosforylace AfGcHK na inkubačním čase

Autofosforylační reakce byla zahájena přidávkem ATP. Po příslušné inkubační době (osa x) byla ukončena a P-AfGcHK byla od AfGcHK separována pomocí SDS-PAGE-Phos-tag. Z intenzit pruhů bylo vypočítáno látkové množství P-AfGcHK, které vzniklo z 11,6 pmol AfGcHK (osa y).

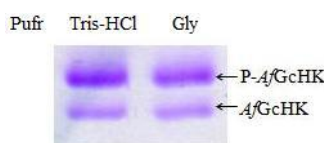
4.4.3 Závislost autofosforylace AfGcHK na pH prostředí

Vliv pH na autofosforylaci AfGcHK byl studován ve směsi, jejíž složení a podmínky reakce jsou popsány v kapitole 3.3.11.3, strana 51. Reakce byla zahájena přidávkem ATP k reakční směsi o příslušném pH (5,5 – 13,0) a byla inkubována 1 minutu. Poté byla reakce ukončena a vzorky byly analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE-Phos-tag (obrázek 23). V pH prostředí 5,0 byl protein denaturován, došlo tedy k inaktivaci enzymové aktivity AfGcHK (dráha pH 5,5, obrázek 23). Jak je patrné z grafu závislosti autofosforylační aktivity AfGcHK na pH prostředí (obrázek 25, strana 74), se zvyšující se hodnotou pH dochází k nárůstu enzymové aktivity AfGcHK. Nejvíce AfGcHK je autofosforylováno při pH prostředí 11,0, a to 9,8 pmol z celkových 11,6 pmol AfGcHK. Při pH prostředí 9,0, kdy je jako pufr použit Tris-HCl došlo k mírnému poklesu enzymové aktivity (obrázek 25, strana 74), nicméně při pH prostředí 9,5, kdy je použit glycinový pufr lze opět pozorovat její nárůst (obrázek 25, strana 74). Byla proto srovnána efektivita autofosforylační reakce v Tris-HCl a glycinovém pufru, při pH 9,0 (obrázek 24, strana 74). V obou těchto pufrech došlo enzymovou reakcí během stejného časového úseku ke vzniku srovnatelného množství P-AfGcHK, a to přibližně 8 pmol. Tím byla vyloučena hypotéza, že by přítomnost glycinu v reakční směsi nějakým způsobem stimulovala enzymovou aktivitu AfGcHK. Aby bylo možné otestovat, průběh autofosforylace AfGcHK také v extrémně zásaditém pH, byla reakční směs inkubována v prostředí obsahujícím 50 mM (dráha pH 12,7, obrázek 23), respektive 100 mM (dráha pH 13, obrázek 23) hydroxid sodný. V těchto podmínkách byla autofosforylační aktivita AfGcHK inaktivována. Ze získaných výsledků tedy vyplývá, že pH optimum autofosforylační reakce AfGcHK je přibližně 11.



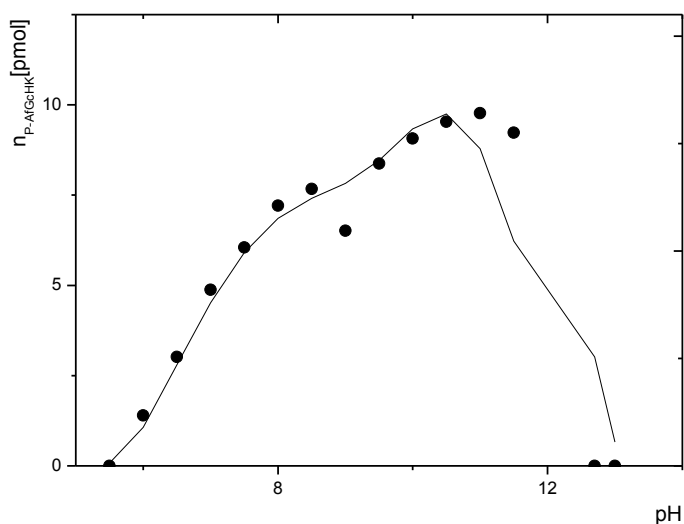
Obrázek 23: Vliv pH na autofosforylaci AfGcHK

Čísla znázorňují pH pufru reakční směsi. Složení reakční směsi pro pH 5,5; 6,0; 6,5 a 7,0: 100 mM fosfátový pufr, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M AfGcHK, pro pH prostředí 7,5; 8,0; 8,5 a 9,0: 100 mM Tris-HCl pufr, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M AfGcHK, pro pH prostředí 9,5; 10,0; 10,5; 11,0; 11,5: 100 mM glycinový pufr, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M AfGcHK, pro pH prostředí 12,7, resp. 13,0: 50 mM, resp. 100 mM hydroxid sodný, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M AfGcH. Pro SDS-PAGE-Phos-tag byl použit 10% separační gel, 75 μ M Phos-tag a 200 μ M chlorid manganatý.



Obrázek 24: Vliv Tris-HCl, pH 9,0 a glycinového pufru, pH 9,0 na autofosforylaci AfGcHK

Složení reakční směsi: 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M AfGcHK a 100 mM glycinový, pH 9,0 nebo 100 mM Tris-HCl pufr, pH 9,0.



Obrázek 25: Vliv pH na autofosforylaci AfGcHK

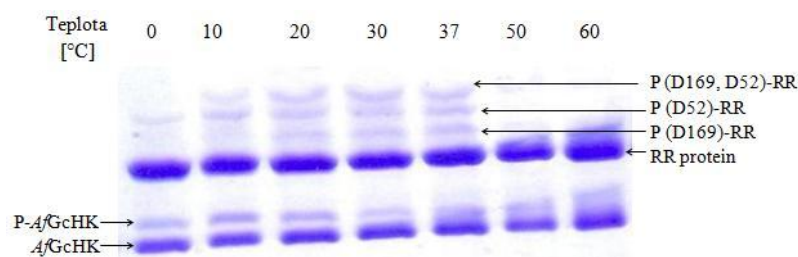
Autofosforylační reakce byla zahájena přidávkou ATP do reakční směsi o příslušném pH (osa x). Po ukončení reakce byla P-AfGcHK od AfGcHK separována pomocí SDS-PAGE-Phos-tag. Z intenzit pruhů bylo vypočítáno látkové množství P-AfGcHK, které vzniklo z 11,6 pmol AfGcHK (osa y).

4.5 Optimalizace podmínek pro studium procesu fosforylace RR proteinu

4.5.1 Teplotní závislost fosforylace RR proteinu

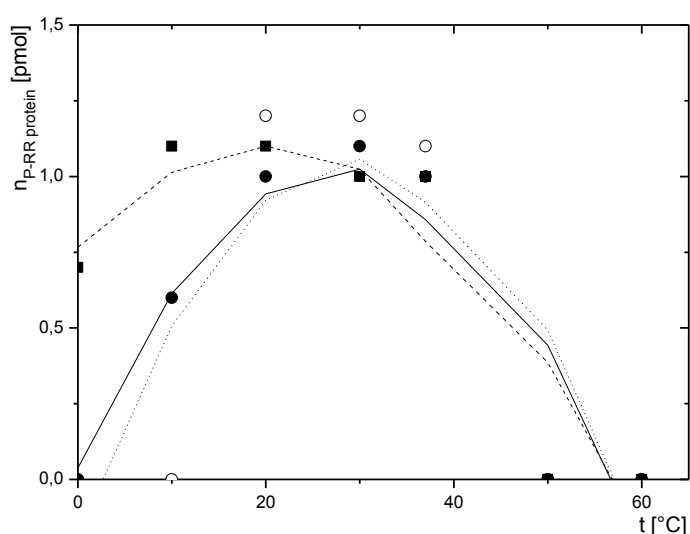
Vliv teploty na přenos fosfátové skupiny na RR protein byl studován ve směsi, jejíž složení a podmínky reakce jsou uvedeny v kapitole 3.3.12.1, strana 52. Reakce byla zahájena přidávkou ATP a probíhala 15 minut při příslušné teplotě (0 °C, 10 °C, 20 °C, 30 °C, 37 °C, 50 °C, 60 °C). Po ukončení reakce byly vzorky analyzovány metodou SDS-PAGE-Phos-tag. Jak již bylo popsáno v kapitole 1.2.1.3, strana 32, RR protein má dvě fosforylační místa Asp52 a Asp169. Jak je patrné z výsledného separačního gelu (obrázek 26, strana 75) při teplotách 0 °C a 10 °C nebyl fosforylován Asp169. Dále bylo zjištěno, že při inkubaci reakční směsi při teplotách vyšších než 37 °C byla získána pouze nefosforylovaná forma RR proteinu (dráhy 50 °C a 60 °C, obrázek 26). Výtěžky

jednotlivých fosforylovaných forem RR proteinu, které byly získány z 12,5 pmol RR proteinu byly zaneseny do grafu (obrázek 27). K nejintenzivnější fosforylaci RR proteinu dochází při inkubaci reakční směsi při 20 °C a 30 °C. Pro studium fosfotransferové reakce RR proteinu bude používána teplota reakční směsi 20 °C.



Obrázek 26: Teplotní závislost fosforylace RR proteinu

Čísla znázorňují teplotu, při které probíhala fosfotrasferová reakce. Složení reakční směsi: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M AfGcHK, 10 μ M RR protein, 1 mM ATP; inkubace 15 min. Jednotlivé fosforylované formy RR proteinu byly označeny analogicky s jejich mobilitou publikovanou v práci [110]. Pro SDS-PAGE-Phos-tag byl použit 10% separační gel, 50 μ M Phos-tag, 200 μ M chlorid manganatý.

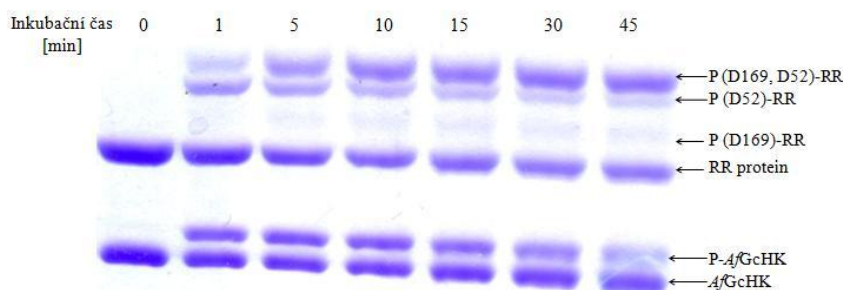


Obrázek 27: Teplotní závislost fosforylace RR proteinu

Fosforylační reakce byla zahájena přidávkem ATP při příslušné teplotě (osa x). Po 15 minutách byla ukončena a P-RR proteinu byla od RR proteinu separována pomocí SDS-PAGE-Phos-tag. Z intenzit pruhů bylo vypočítáno látkové množství jednotlivých forem P-RR proteinu, které vzniklo z 12,5 pmol RR proteinu (osa y). Plný kroužek a plná křivka značí P(D169, D52)-RR protein, prázdný kroužek a tečkovaná křivka značí P(D169)-RR protein a plný čtvereček a čárkovaná křivka značí P(D52)-RR protein.

4.5.2 Časová závislost fosforylace RR proteinu

Časová závislost fosforylace RR proteinu byla studována ve směsi, jejíž složení a podmínky reakce jsou uvedeny v kapitole 3.3.12.2, strana 52. Reakce byla zahájena přidávkem ATP. Inkubační časy reakční směsi byly 0 min, 1 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min a 45 min. Po ukončení reakce byly vzorky analyzovány metodou SDS-PAGE-Phos-tag. Z výsledného separačního gelu (obrázek 28) vyplývá, že pokud není do směsi přidáno ATP (dráha 0 min, obrázek 28) k fosforylaci RR proteinu nedochází. Po zahájení reakce přidávkem ATP byl nejprve autofosforylován AfGcHK a poté došlo také k fosforylaci RR proteinu. Už po 1 minutě po zahájení reakce přidávkem ATP lze pozorovat nárůst difosforylované formy RR proteinu (obrázek 28). Na separačním gelu došlo také k rozdělení jednotlivých monofosforylovaných forem Asp52 a Asp169 (obrázek 28). S rostoucím inkubačním časem reakční směsi dochází k nárůstu difosforylované formy RR proteinu (body značené plným kroužkem, obrázek 29, strana 77), zatímco množství monofosforylované formy Asp52 se snižuje (body značené plným čtverečkem, obrázek 29, strana 77). Množství monofosforylované formy Asp169 zůstává s narůstající inkubační dobou téměř konstantní, a to přibližně 0,3 až 0,5 pmol (body značené prázdným kroužkem obrázek 29, strana 77).

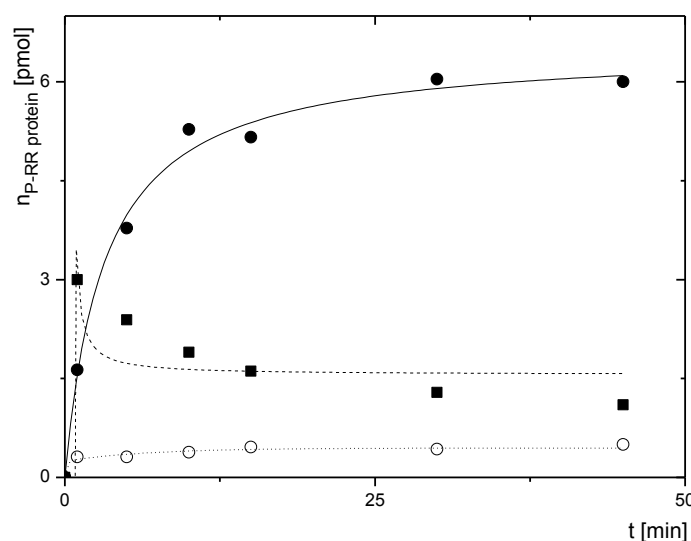


Obrázek 28: Časová závislost fosforylace RR proteinu

Čísla znázorňují inkubační čas reakční směsi. Složení reakční směsi: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M AfGcHK, 10 μ M RR protein, 1 mM ATP.

Jednotlivé fosforylované formy RR proteinu byly označeny analogicky s jejich mobilitou publikovanou v práci [110]

Pro SDS-PAGE-Phos-tag byl použit 10% separační gel, 75 μ M Phos-tag, 200 μ M chlorid manganatý.

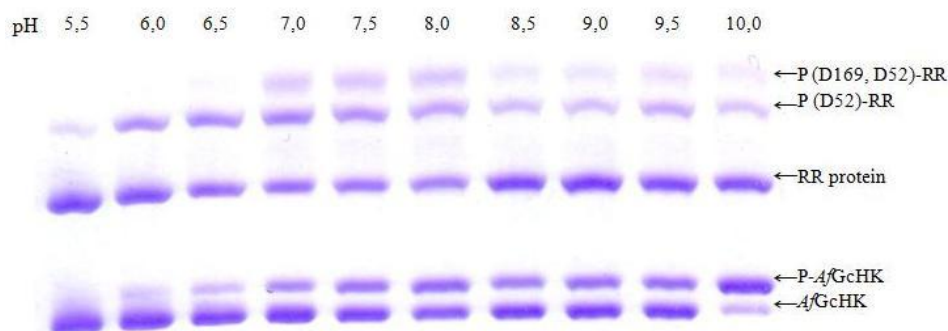


Obrázek 29: Časová závislost fosforylace RR proteinu

Plný kroužek a plná křivka značí P (D169, D52)-RR protein, prázdný kroužek a tečkovaná křivka značí P (D169)-RR protein a plný čtvereček a čárkovaná křivka značí P (D52)-RR protein. Fosforylační reakce byla zahájena přidavkem ATP. Po příslušné inkubační době (osa x) byla ukončena a P-RR proteinu byla od RR proteinu separována pomocí SDS-PAGE-Phos-tag. Z intenzit pruhů bylo vypočítáno látkové množství jednotlivých forem P-RR proteinu, které vzniklo z 12,5 pmol RR proteinu (osa y).

4.5.3 Závislost fosforylace RR proteinu na pH prostředí

Pro studium optimálního pH fosforylace RR proteinu byla vytvořena směs, jejíž složení a podmínky reakce jsou uvedeny v kapitole 3.3.12.3, strana 52. Reakce byla zahájena přidavkem ATP do reakční směsi o příslušném pH (5,5 – 10,0). Po 1 minutě byla reakce ukončena a odebrané vzorky byly analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE-Phos-tag. Fosforylace RR proteinu závisí na stupni fosforylace AfGCHK, jehož pH optimum je přibližně 11 (kapitola 4.4.3, strana 73). Je proto složité porovnat jednotlivé výtěžky P-RR proteinu, protože koncentrace pravděpodobného substrátu RR proteinu (tedy P-AfGCHK) nebyla v jednotlivých reakčních směsích o příslušném pH stejná (tento fakt lze pozorovat na výsledném separačním gelu na obrázku 30, strana 78 v jeho spodní části). I přes to lze říci, že hodnota látkového množství difosforylované formy RR proteinu je nejvyšší při pH 7,5 – 8,0, a to přibližně 4 pmol z celkových 12,5 pmol RR proteinu (plný kroužek, obrázek 31, strana 78). Zároveň s rostoucím množstvím difosforylované formy se snižuje množství monofosforylované formy Asp52 (plný čtvereček, obrázek 31, strana 78). Optimum pH pro fosforylaci RR proteinu je mezi 7,5 až 8,0.

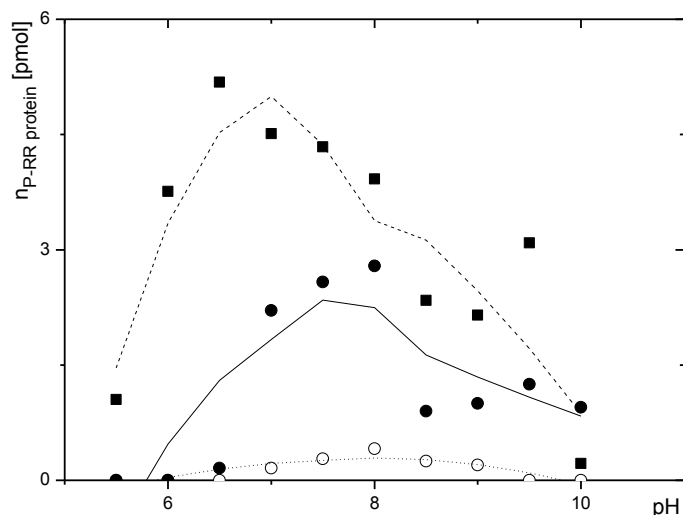


Obrázek 30: Závislost fosforylace RR proteinu na pH prostředí

Čísla znázorňují pH pufru v reakční směsi. Složení reakční směsi pro pH 5,5; 6,0; 6,5 a 7,0: 100 mM fosfátový pufr, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M AfGcHK, 10 μ M RR protein, pro pH prostředí 7,5; 8,0; 8,5 a 9,0: 100 mM Tris-HCl pufr, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M AfGcHK, 10 μ M RR protein, pro pH prostředí 9,5; 10,0: 100 mM glycinový pufr, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M AfGcHK, 10 μ M RR protein.

Jednotlivé fosforylované formy RR proteinu byly označeny analogicky s jejich mobilitou publikovanou v práci [110].

Pro SDS-PAGE-Phos-tag byl použit 10% separační gel, 75 μ M Phos-tag, 200 μ M chlorid manganatý.



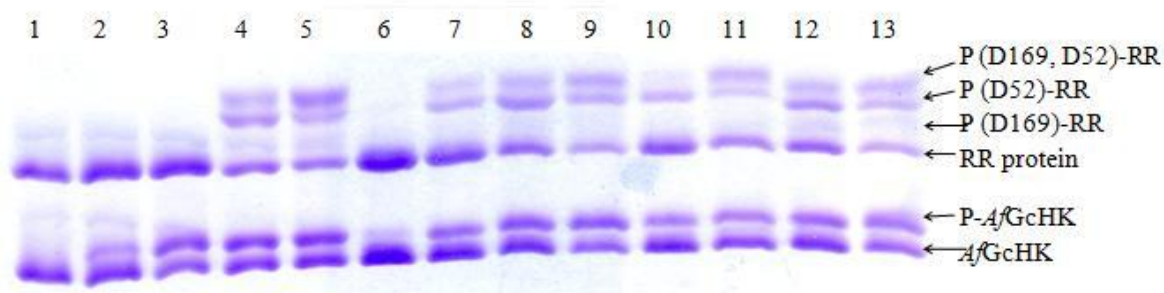
Obrázek 31: Závislost fosforylace RR proteinu na pH prostředí

Plný kroužek a plná křivka značí P (D169, D52)-RR protein, prázdný kroužek a tečkovaná křivka značí P (D169)-RR protein a plný čtvereček a čárkovaná křivka značí P (D52)-RR protein. Fosforylační reakce byla zahájena přidáním ATP do reakční směsi o příslušném pH (osa x). Po ukončení reakce byla P-RR proteinu od RR proteinu separována pomocí SDS-PAGE-Phos-tag. Z intenzit pruhů bylo vypočítáno látkové množství jednotlivých forem P-RR proteinu, které vzniklo z 12,5 pmol RR proteinu (osa y).

4.6 Studium mechanismu histidinkinasové reakce AfGcHK a fosfotrasferu na RR protein

4.6.1 Studium vlivu dvojmocných kationtů na autofosforylaci AfGcHK a na fosforylaci RR proteinu

Pro studium vlivu hořečnatých a vápenatých kationtů na autofosforylační reakci AfGcHK a fosforylaci RR proteinu byla vytvořena směs, jejíž složení a podmínky reakce jsou popsány v kapitole 3.3.13.1, strana 53. Reakce byly zahájeny přidavkem ATP a po ukončení byly vzorky analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE-Phos-tag. I přes absenci dvojmocných kationtů v reakční směsi, dochází po přidavku ATP k autofosforylační reakci AfGcHK (dráhy 2 a 3, obrázek 32, strana 80). Naproti tomu fosfotransferová reakce na RR protein bez přidavku dvojmocných kationtů téměř neprobíhá (dráhy 2 a 3 obrázek 32, strana 80). Po přidavku hořečnatých kationtů do reakční směsi dochází k nárůstu P-AfGcHK a zároveň k velmi masivní fosforylaci RR proteinu (dráhy 4 a 5, obrázek 32, strana 80). Vápenaté kationty mají na autofosforylační a fosforylační aktivitu méně pozitivní vliv než hořečnaté kationty (dráha 7, obrázek 32, strana 80). Pokud reakce probíhala 1 minutu, nedošlo při inkubaci s vápenatými kationty ani k autofosforylační, ani k fosfotransferové reakci (dráha 6, obrázek 32, strana 80). V případě, kdy byl ke směsi přidán 2,5 mM chlorid hořečnatý, tedy poloviční koncentrace než v předchozích experimentech (dráhy 10 a 11, obrázek 32, strana 80) nedocházelo k výraznému ovlivnění autofosforylace AfGcHK. Při použití této nižší koncentrace hořečnatých kationtů je však ovlivněna tvorba difosforylované formy RR proteinu (dráha 10, obrázek 32, strana 80). Pokud je do směsi přidán nadbytek chloridu hořečnatého, tedy 10 mM chlorid hořečnatý, je stupeň autofosforylace AfGcHK i fosforylace RR proteinu srovnatelný se situací, kdy byl použit 5 mM chlorid hořečnatý (dráhy 12 a 13, obrázek 32, strana 80). Ze získaných výsledků vyplývá, že pro autofosforylaci AfGcHK není přítomnost hořečnatých kationtů v reakční směsi esenciální, ale je klíčová pro proces fosforylace RR proteinu.



Obrázek 32: Vliv dvojmocných kationtů na autofosforylaci AfGcHK a fosfotransferovou reakci RR proteinu

V jednotlivých drahách jsou naneseny následující vzorky:

1: negativní kontrola

2: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 10 μM AfGcHK, 10 μM RR protein, 1 mM ATP; inkubace 1 min

3: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 10 μM AfGcHK, 10 μM RR protein, 1 mM ATP; inkubace 5 min

4: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μM AfGcHK, 10 μM RR protein, 1 mM ATP; inkubace 1 min

5: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μM AfGcHK, 10 μM RR protein, 1 mM ATP; inkubace 5 min

6: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid vápenatý, 10 μM AfGcHK, 10 μM RR protein, 1 mM ATP; inkubace 1 min

7: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid vápenatý₂, 10 μM AfGcHK, 10 μM RR protein, 1 mM ATP; inkubace 5 min

8: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 5 mM chlorid vápenatý, 10 μM AfGcHK, 10 μM RR protein, 1 mM ATP; inkubace 1 min

9: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 5 mM chlorid vápenatý, 10 μM AfGcHK, 10 μM RR protein, 1 mM ATP; inkubace 5 min

10: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 2,5 mM chlorid hořečnatý, 10 μM AfGcHK, 10 μM RR protein, 1 mM ATP; inkubace 1 min

11: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 2,5 mM chlorid hořečnatý, 10 μM AfGcHK, 10 μM RR protein, 1 mM ATP; inkubace 5 min

12: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 10 mM chlorid hořečnatý, 10 μM AfGcHK, 10 μM RR protein, 1 mM ATP; inkubace 1 min

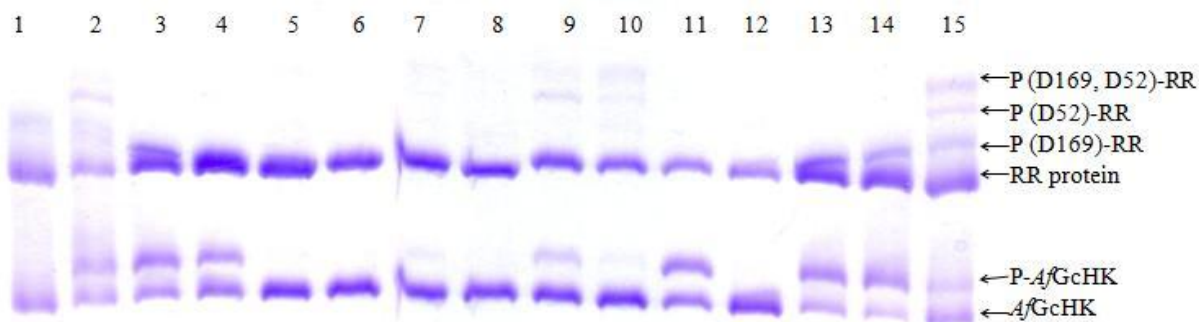
13: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 10 mM chlorid hořečnatý, 10 μM AfGcHK, 10 μM RR protein, 1 mM ATP; inkubace 5 min

Jednotlivé fosforylované formy RR proteinu byly označeny analogicky s jejich mobilitou publikovanou v práci [110].

Pro SDS-PAGE-Phos-tag byl použit 10% separační gel, 75 μM Phos-tag, 200 μM chlorid manganatý.

4.6.2 Popis vlastností a mechanismu participace RR proteinu na své fosforylaci

Cílem experimentů popsaných v této kapitole bylo zjistit, jestli P-*AfGcHK* je přímým substrátem RR proteinu a dále zda za fosfotransfer na RR protein je zodpovědná enzymová aktivita *AfGcHK* nebo RR proteinu. Byla proto provedena separace P-*AfGcHK* od *AfGcHK* (kapitola 3.3.13.4, strana 56) s úmyslem získat čistý preparát P-*AfGcHK*. Analýza výsledného preparátu pomocí SDS-PAGE-Phos-tag však ukázala, že obsahoval přibližně 15 % nefosforylované formy *AfGcHK* (data nejsou ukázána). Ze směsi obsahující nadbytek P-*AfGcHK* bylo úspěšně odstraněno ATP a ADP (kapitola 3.3.13.2, strana 54) a získaný preparát byl použit pro následující experimenty. Složení směsí a podmínky reakcí těchto experimentů jsou popsány v kapitole 3.3.13.4, strana 56. V nepřítomnosti ATP a dvojmocných kationtů k přenosu fosfátové skupiny z P-*AfGcHK* na RR protein téměř nedochází (dráhy 3, 4 a 11 obrázek 33, strana 82). Interpretace tohoto výsledku není jednoznačná, každopádně vzhledem k autofosforylaci *AfGcHK* je míra fosforylace RR proteinu zanedbatelná (dráha 3, obrázek 33, strana 82). Nicméně výsledek je logický vzhledem k závěrům předchozí kapitoly, kde bylo prokázáno, že přítomnost hořčnatých kationtů je pro fosforylaci RR proteinu esenciální na rozdíl do autofosforylační aktivity *AfGcHK*. Pokud byly do směsi obsahující *AfGcHK*, P-*AfGcHK* a RR protein dodány hořčnaté kationty, nebyla pozorována fosforylace RR proteinu a navíc byl P-*AfGcHK* defosforylován (dráhy 5, 6, 7, 8 a 12, obrázek 33, strana 82). Pokud byly hořčnaté kationty nahrazeny vápenatými, defosforylace P-*AfGcHK* probíhala s nižší rychlostí a zároveň bylo možné pozorovat fosforylaci RR proteinu (dráhy 9 a 10, obrázek 33, strana 82). Defosforylace P-*AfGcHK* je potlačena přidáním ATP do směsi, zároveň dochází k mírnému nárůstu fosforylované formy RR proteinu (dráhy 13 a 14, obrázek 33, strana 82). Pokud byl ATP nahrazen ATP^A nedocházelo v přítomnosti hořčnatých kationtů ani k fosforylaci RR proteinu, ani k defosforylaci *AfGcHK* (data nejsou ukázána). Nárůst fosforylované formy RR proteinu je jednoznačně největší pokud je ke směsi obsahující *AfGcHK*, P-*AfGcHK* a RR protein přidáno ATP spolu s hořčnatými kationty (dráha 15, obrázek 33, strana 82). Pokud je ATP nahrazeno ATP^A, k fosforylaci RR proteinu nedochází (data nejsou ukázána). P-*AfGcHK* ani *AfGcHK* nemá fosfatasovou aktivitu vůči P-*AfGcHK*, a to jak s hořčnatými kationty, tak bez hořčnatých kationtů (data nejsou ukázána). Bylo tedy zjištěno, že RR protein je enzymem, který má fosfatasovou aktivitu (v přítomnosti hořčnatých kationtů). Jestli má RR protein také fosfotransferasovou aktivitu bylo předmětem studia v následující kapitole.



Obrázek 33: Vliv dvojmocných kationtů na fosforylaci RR proteinu v přítomnosti P-AfGcHK

V jednotlivých drahách jsou naneseny následující vzorky:

1: negativní kontrola

2: pozitivní kontrola

3: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 10 μ M P-AfGcHK, 10 μ M RR protein; inkubace 5 min

4: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 10 μ M P-AfGcHK, 10 μ M RR protein; inkubace 30 min

5: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M P-AfGcHK, 10 μ M RR protein; inkubace 5 min

6: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M P-AfGcHK, 10 μ M RR protein; inkubace 30 min

7: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 2,5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M P-AfGcHK, 10 μ M RR protein; inkubace 5 min

8: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 10 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M P-AfGcHK, 10 μ M RR protein; inkubace 5 min

9: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid vápenatý, 10 μ M P-AfGcHK, 10 μ M RR protein; inkubace 5 min

10: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid vápenatý, 10 μ M P-AfGcHK, 10 μ M RR protein; inkubace 30 min

11: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 10 μ M P-AfGcHK, 5 μ M RR protein; inkubace 30 min

12: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M P-AfGcHK, 5 μ M RR protein; inkubace 30 min

13: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 10 μ M P-AfGcHK, 10 μ M RR protein, 1 mM ATP; inkubace 1 min

14: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 10 μ M P-AfGcHK, 10 μ M RR protein, 1 mM ATP; inkubace 5 min

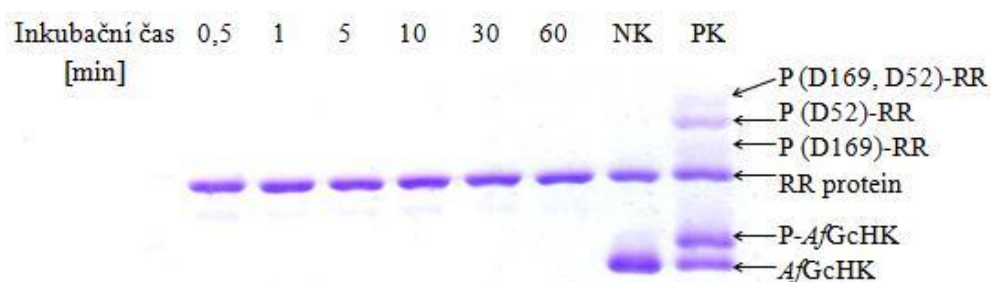
15: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M P-AfGcHK, 10 μ M RR protein, 1 mM ATP; inkubace 5 min

Jednotlivé fosforylované formy RR proteinu byly označeny analogicky s jejich mobilitou publikovanou v práci [110].

Pro SDS-PAGE-Phos-tag byl použit 10% separační gel, 75 μ M Phos-tag, 200 μ M chlorid manganatý.

4.6.3 Studium využití různých donorů fosfátu (jiných než P-AfGcHK) jako substrátů pro fosfotransfer na RR protein

Bylo studováno, zda některý z vybraných donorů fosfátu (fosfoenolpyruvát, acetylfosfát, ATP v nepřítomnosti AfGcHK, ATP^A a fosforamidát) může sloužit jako substrát pro fosforylaci RR proteinu (kapitola 3.3.14, strana 58). Pokud by byl takový substrát nalezen, naznačilo by to možnost, že RR protein vykazuje autofosforylační enzymovou aktivitu. V předchozí kapitole bylo prokázáno, že RR protein má jak autofosfatasovou, tak fosfatasovou aktivitu vůči P-AfGcHK. Prvním studovaným donorem fosfátu byl fosfoenolpyruvát. Z výsledného separačního gelu (obrázek 34) vyplývá, že k přenosu fosfátové skupiny z fosfoenolpyruvátu na RR protein nedochází. Dále byl studován vliv ATP, jako donoru fosfátu na fosforylaci RR proteinu. Také v tomto případě nebyl RR protein fosforylován (data nejsou ukázána). Z výsledného separačního gelu SDS-PAGE-Phos-tag experimentu, kdy byl RR protein inkubován 5 minut s ATP^A vyplývá, že ATP^A může částečně sloužit jako substrát pro fosfotrasferovou reakci RR proteinu (dráha 5 min, obrázek 35, strana 84). Stupeň fosforylace RR proteinu je však na hranici detekce a mobilita pruhu, který je připisován P-RR proteinu se neshoduje s mobilitou pruhů pozitivní kontroly. Je pravděpodobné, že se jedná buď o nespecifickou fosforylaci, nebo artefakt. Pokud inkubace RR proteinu s ATP^A byla 30 minut, k fosforylaci RR proteinu nedošlo (dráha 30 min, obrázek 35, strana 84).

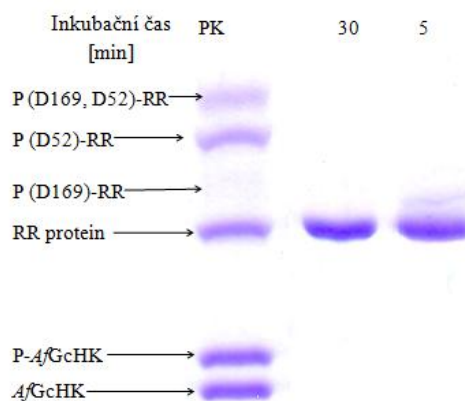


Obrázek 34: Vliv fosfoenolpyruvátu na fosforylaci RR proteinu

Čísla znázorňují, jak dlouho byl RR protein inkubován s fosfoenolpyruvátem, NK značí negativní kontrolu, PK značí pozitivní kontrolu. Složení reakční směsi: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μM RR protein, 1 mM fosfoenolpyruvát.

Jednotlivé fosforylované formy RR proteinu byly označeny analogicky s jejich mobilitou publikovanou v práci [110].

Pro SDS-PAGE-Phos-tag byl použit 10% separační gel, 75 μM Phos-tag, 200 μM chlorid manganatý.



Obrázek 35: Vliv ATP^A na fosforylaci RR proteinu

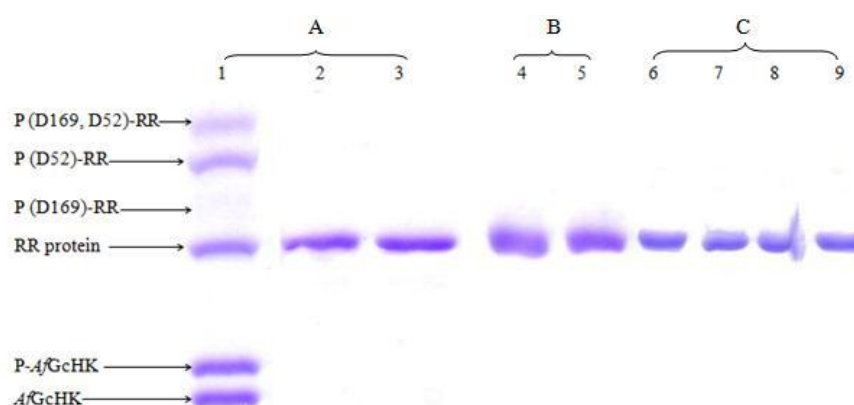
Čísla znázorňují, jak dlouho byl RR protein inkubován s ATP^A , PK značí pozitivní kontrolu.

Složení reakční směsi: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μM RR protein, 1 mM ATP^A . Jednotlivé fosforylované formy RR proteinu byly označeny analogicky s jejich mobilitou publikovanou v práci [110].

Pro SDS-PAGE-Phos-tag byl použit 10% separační gel, 75 μM Phos-tag, 200 μM chlorid manganatý.

Vliv acetylfosfátu na fosforylaci RR proteinu byl studován v Tris-HCl pufru, pH 8,0 (dráhy A2 a A3, obrázek 36, strana 85) a ve fosfátovém pufru, pH 6,0 (dráhy B4 a B5, obrázek 36, strana 85). Ani v jednom případě však nedošlo k fosforylaci RR proteinu. Nárůst fosforylované formy RR proteinu nebyl podpořen ani inkubací RR proteinu s acetylfosfátem a ATP ve fosfátovém pufru, pH 6,0 (dráhy C7, C8 a C9, obrázek 36, strana 85).

Jako poslední donor fosfátu byl testován fosforamidát. Při jedné z nejvyšších testovaných koncentrací fosforamidátu (100 mM) a nejvyšší použité koncentraci hořečnatých kationtů (dráha 8, obrázek 37, strana 86) lze na výsledném separačním gelu pozorovat frakci proteinu (pruh), která svou mobilitou odpovídá fosforylované formě RR proteinu. Intenzita tohoto pruhu však byla velmi nízká, k vizualizaci musela být proto použita metoda barvení stříbrem (kapitola 3.3.10, strana 49). Identifikovaná fosfoforma RR proteinu naznačovala, že za určitých podmínek může fosforamidát sloužit jako substrát pro specifickou autofosforylační enzymovou reakci RR proteinu. Dále byl testován vliv koncentrace hořečnatých kationtů na tuto reakci (obrázek 38, strana 87). Autofosforylační aktivita byla také pozorována při dlouhých inkubačních časech reakční směsi (dráhy 11 a 12, obrázek 37, strana 86). Autofosforylace RR proteinu při použití fosforamidátu jako substrátu byla podpořena přidávkem ATP (dráha 13, obrázek 37, strana 86) v případě dlouhých inkubačních časů.



Obrázek 36: Vliv acetylfosfátu na fosforylaci RR proteinu

V jednotlivých drahách jsou naneseny následující vzorky:

A1: pozitivní kontrola

A2: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μM RR protein, 1 mM acetylfosfát; inkubace 30 minut

A3: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μM RR protein, 1 mM acetylfosfát; inkubace 60 minut

B4: 100 mM fosfátový pufr, pH 6,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μM RR protein, 1 mM acetylfosfát; inkubace 1 minutu

B5: 100 mM fosfátový pufr, pH 6,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μM RR protein, 1 mM acetylfosfát; inkubace 5 minut

C6: 100 mM fosfátový pufr, pH 6,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μM RR protein, 1 mM acetylfosfát; inkubace 180 minut

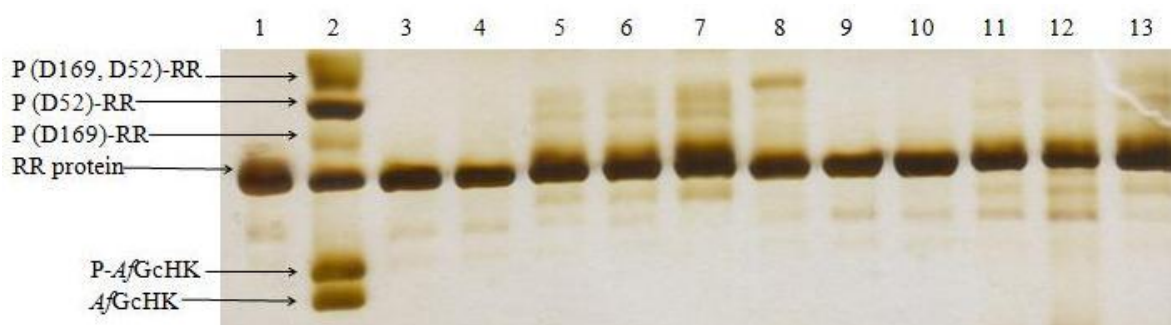
C7: 100 mM fosfátový pufr, pH 6,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μM RR protein, 1 mM acetylfosfát, 1 mM ATP; inkubace 1 minutu

C8: 100 mM fosfátový pufr, pH 6,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μM RR protein, 1 mM acetylfosfát, 1 mM ATP; inkubace 60 minut

C9: 100 mM fosfátový pufr, pH 6,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μM RR protein, 1 mM acetylfosfát, 1 mM ATP; inkubace 180 minut

Jednotlivé fosforylované formy RR proteinu byly označeny analogicky s jejich mobilitou publikovanou v práci [110].

Pro SDS-PAGE-Phos-tag byl použit 10% separační gel, 75 μM Phos-tag, 200 μM chlorid manganatý.



Obrázek 37: Vliv fosforamidátu na fosforylaci RR proteinu

V jednotlivých drahách jsou naneseny následující vzorky:

1: negativní kontrola

2: pozitivní kontrola

3: 100 mM fosfátový pufr, pH 7,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M RR protein, 10 mM fosforamidát; inkubace 180 minut

4: 100 mM fosfátový pufr, pH 7,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M RR protein, 20 mM fosforamidát; inkubace 180 minut

5: 100 mM fosfátový pufr, pH 7,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M RR protein, 50 mM fosforamidát; inkubace 180 minut

6: 100 mM fosfátový pufr, pH 7,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M RR protein, 100 mM fosforamidát; inkubace 180 minut

7: 100 mM fosfátový pufr, pH 7,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M RR protein, 160 mM fosforamidát; inkubace 180 minut

8: 100 mM fosfátový pufr, pH 7,0, 50 mM chlorid draselný, 50 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M RR protein, 100 mM fosforamidát; inkubace 180 minut

9: 100 mM fosfátový pufr, pH 7,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M RR protein, 20 mM fosforamidát; inkubace 60 minut

10: 100 mM fosfátový pufr, pH 7,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M RR protein, 20 mM fosforamidát; inkubace 180 minut

11: 100 mM fosfátový pufr, pH 7,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M RR protein, 20 mM fosforamidát; inkubace 900 minut

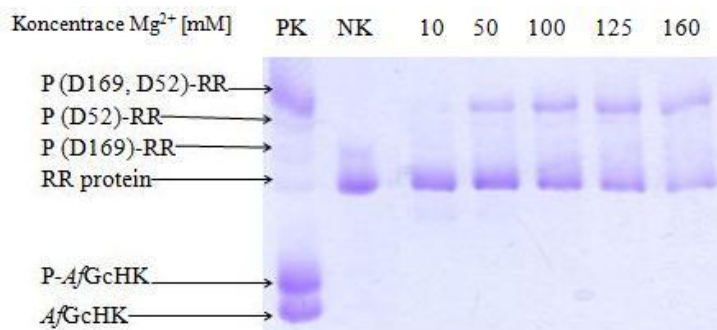
12: 100 mM fosfátový pufr, pH 7,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M RR protein, 20 mM fosforamidát; inkubace 1320 minut

13: 100 mM fosfátový pufr, pH 7,0, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μ M RR protein, 100 mM fosforamidát, 1 mM ATP; inkubace 180 minut

Jednotlivé fosforylované formy RR proteinu byly označeny analogicky s jejich mobilitou publikovanou v práci [110].

Pro SDS-PAGE-Phos-tag byl použit 10% separační gel, 75 μ M Phos-tag, 200 μ M chlorid manganatý.

Autofosforylační enzymová reakce RR proteinu vykazuje vůči hořečnatým kationtům saturační kinetiku (obrázek 39). Saturační koncentrace hořečnatých kationtů je v enzymové reakci obsahující 160 mM fosforamidát a 10 μ M RR protein přibližně 160 mM.

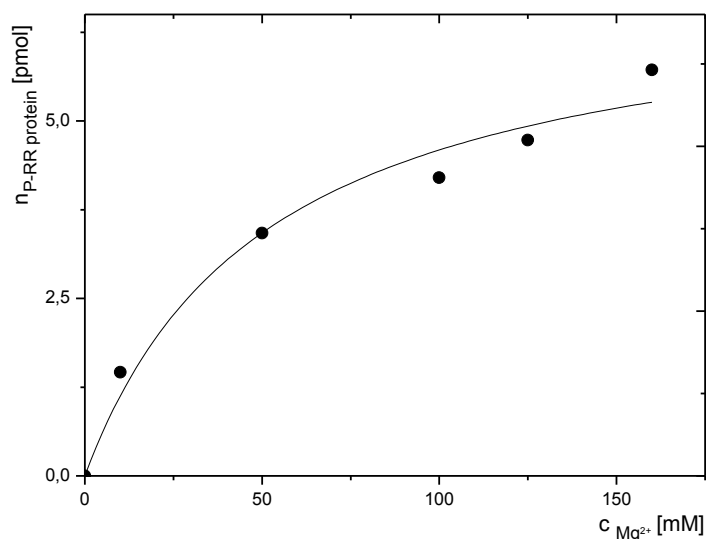


Obrázek 38: Vliv koncentrace hořečnatých kationtů na autofosforylační aktivitu RR proteinu

Čísla vyjadřují koncentraci hořečnatých kationtů v reakční směsi obsahující 100 mM fosfátový pufr, pH 7,0, 50 mM chlorid draselný, 10 μ M RR protein, 160 mM fosforamidát; PK značí pozitivní kontrolu, NK značí negativní kontrolu.

Jednotlivé fosforylované formy RR proteinu byly označeny analogicky s jejich mobilitou publikovanou v práci [110].

Pro SDS-PAGE-Phos-tag byl použit 10% separační gel, 75 μ M Phos-tag, 200 μ M chlorid manganatý.

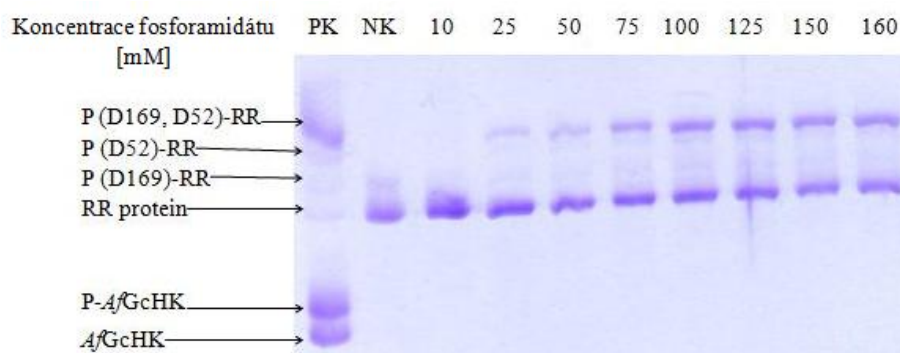


Obrázek 39: Závislost autofosforylace RR proteinu na koncentraci hořečnatých kationtů

Fosforylační reakce byla zahájena přidávkem 160 mM fosforamidátu do reakční směsi s příslušnou koncentrací chloridu hořečnatého (osa x). Po ukončení reakce byla P-RR proteinu od RR proteinu separována pomocí SDS-PAGE-Phos-tag. Z intenzit pruhů bylo vypočítáno látkové množství jednotlivých forem P-RR proteinu, které vzniklo z 12, 5 pmol RR proteinu (osa y).

4.6.4 Stanovení kinetických parametrů autofosforylační aktivity RR proteinu při použití fosforamidátu jako substrátu

Závislost autofosforylace RR proteinu při použití fosforamidátu jako substrátu byla studována v roztocích, jejichž složení a podmínky reakce jsou uvedeny v kapitole 3.3.14.4, strana 59. Bylo použito saturační množství hořečnatých kationtů identifikované v předchozí kapitole. Reakce byla zahájena přidávkem fosforamidátu o příslušné výsledné koncentraci a trvala 315 minut. Po jejím ukončení byly vzorky analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE-Phos-tag (obrázek 40). Dle postupu popsáno v kapitole 3.3.17, strana 63 byla vypočítána hodnota počáteční rychlosti enzymové reakce. Tyto hodnoty pro jednotlivé koncentrace jsou zobrazeny v tabulce 3, strana 89. Kinetika autofosforylační enzymové reakce RR proteinu odpovídá klasickému průběhu kinetiky enzymových reakcí dle Michaelise a Mentenové (obrázek 41, strana 89) [134]. Byly proto určeny kinetické parametry pomocí Lineaweaver-Burkova výnosu (obrázek 42, strana 90) [132]. Ze získané regresní rovnice byla stanovena hodnota Michaelisovy konstanty autofosforylační reakce RR proteinu vzhledem k fosforamidátu jako substrátu a hodnota maximální rychlosti reakce vzhledem k fosforamidátu. Tyto hodnoty jsou rovny 65 mM a 0,02 pmol P-RR proteinu.min⁻¹.μl⁻¹.



Obrázek 40: Závislost autofosforylace RR proteinu na koncentraci fosforamidátu

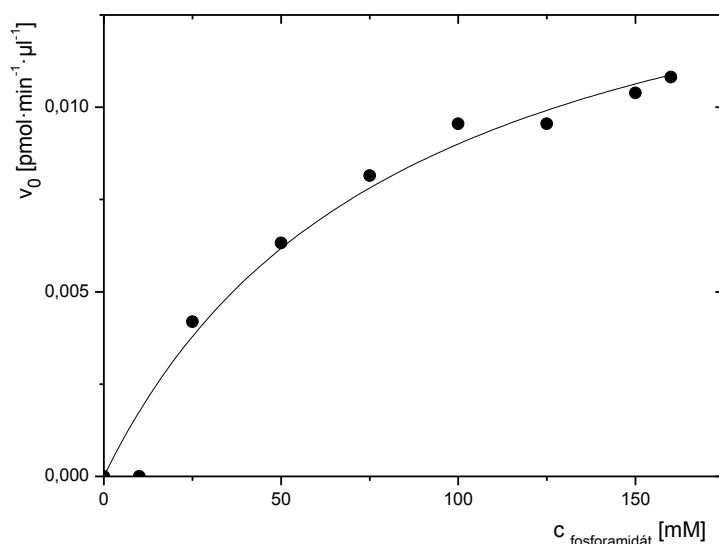
Čísla znázorňují koncentraci fosforamidátu v reakční směsi, obsahující 100 mM fosfátový pufr, pH 7,0, 50 mM chlorid draselný, 160 mM chlorid hořečnatý, 10 μM RR protein. PK značí pozitivní kontrolu, NK značí negativní kontrolu. Jednotlivé fosforylované formy RR proteinu byly označeny analogicky s jejich mobilitou publikovanou v práci [110].

Pro SDS-PAGE-Phos-tag byl použit 10% separační gel, 75 μM Phos-tag, 200 μM chlorid manganatý.

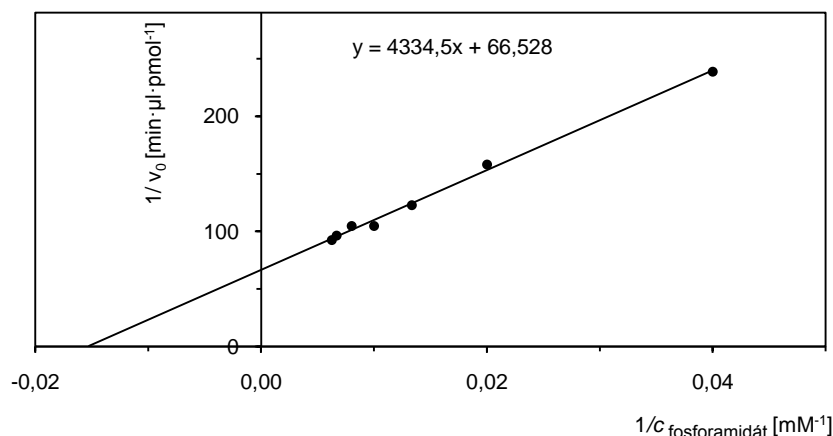
Tabulka 3: Závislost autofosforylace RR proteinu na koncentraci fosforamidátu

Fosforylační reakce byla zahájena přidavkem fosforamidátu o příslušné koncentraci do reakční směsi. Po ukončení reakce byla P-RR proteinu od RR proteinu separována pomocí SDS-PAGE-Phos-tag. Z intenzit pruhů bylo vypočítáno látkové množství jednotlivých forem P-RR proteinu, které vzniklo z 12, 5 pmol RR proteinu. Z této hodnoty byla poté zjištěna hodnota počáteční rychlosti enzymové reakce.

Koncentrace fosforamidátu [mM]	0,000	10,000	25,000	50,000	75,000
v_0 [pmol P-RR proteinu.min⁻¹.μl⁻¹]	0,000	0,000	0,004	0,006	0,008
Koncentrace fosforamidátu [mM]	100,000	125,000	150,000	160,000	
v_0 [pmol P-RR proteinu.min⁻¹.μl⁻¹]	0,010	0,010	0,010	0,010	0,011

**Obrázek 41: Závislost počáteční rychlosti autofosforylace RR proteinu na koncentraci fosforamidátu**

Fosforylační reakce byla zahájena přidavkem fosforamidátu o příslušné koncentraci do reakční směsi (osa x). Po ukončení reakce byla P-RR proteinu od RR proteinu separována pomocí SDS-PAGE-Phos-tag. Z intenzit pruhů bylo vypočítáno látkové množství jednotlivých forem P-RR proteinu, které vzniklo z 12, 5 pmol RR proteinu. Z této hodnoty byla poté zjištěna hodnota počáteční rychlosti enzymové reakce (osa y). Výslednými body byla proložena hyperbola, kterou popisuje funkce Michaelise a Mentenové [134].



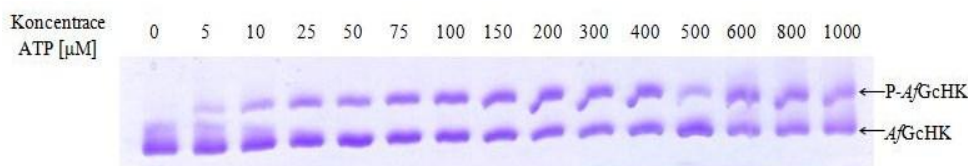
Obrázek 42: Dvojitý reciproký výnos závislosti počáteční rychlosti autofosforylace RR proteinu na koncentraci fosforamidátu

Na obrázku je uvedena regresní rovnice, která byla použita k výpočtu kinetických parametrů.

4.7 Stanovení kinetických parametrů enzymové reakce AfGcHK

4.7.1 Studium závislosti autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP

Složení reakční směsi, prostřednictvím které byla studována závislost autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP a podmínky této reakce jsou uvedeny v kapitole 3.3.15.1, strana 62. Reakce byla zahájena přidavkem ATP o příslušné výsledné koncentraci k reakční směsi. Reakce probíhala 30 sekund. Bylo ověřeno, že v tomto časovém intervalu probíhá daná enzymová reakce počáteční rychlostí (kapitola 3.3.11.2, strana 50). Po ukončení reakce byly odebrané vzorky analyzovány metodou SDS-PAGE-Phos-tag (obrázek 43, strana 91). Dle postupu popsání v kapitole 3.3.17, strana 63 byla vypočítána hodnota počáteční rychlosti enzymové reakce. Tyto hodnoty pro jednotlivé koncentrace jsou zobrazeny v tabulce 4, strana 91. Z grafu závislosti počáteční rychlosti autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP vyplývá, že kinetika autofosforylační reakce AfGcHK odpovídá klasickému průběhu kinetiky enzymových reakcí dle Michaelise a Mentenové (obrázek 44, strana 91) [134]. Bylo proto možné určit kinetické parametry této enzymové reakce dvojitě reciprokým vnesením získaných hodnot (obrázek 45, strana 92) [132]. Ze získané regresní rovnice byla vypočtena hodnota Michaelisovy konstanty pro autofosforylační reakci AfGcHK vzhledem k ATP jako substrátu, tato konstanta má hodnotu 18 μM a hodnota maximální rychlosti enzymové reakce vzhledem k ATP je 10 $\text{pmol P-AfGcHK} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.



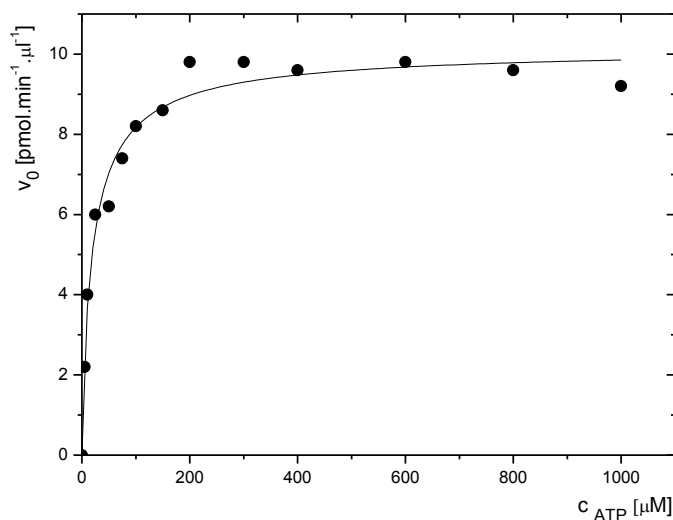
Obrázek 43: Závislost autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP

Čísla znázorňují koncentraci ATP ve výsledné reakční směsi obsahující 50 mM Tris-HCl, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 µM AfGcHK. Pro SDS-PAGE-Phos-tag byl použit 10% separační gel, 75 µM Phos-tag a 200 µM chlorid manganatý

Tabulka 4: Závislost autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP

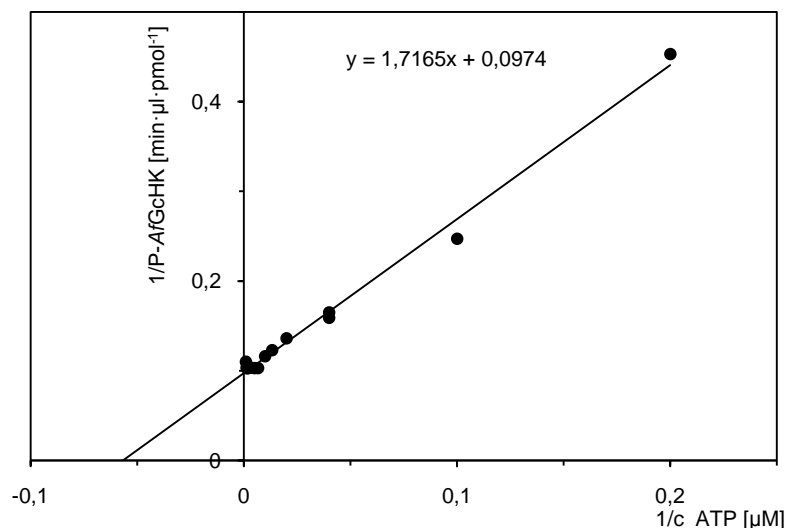
Autofosforylační reakce AfGcHK byla zahájena přidavkem ATP o příslušné koncentraci do reakční směsi. Po ukončení reakce byla P-AfGcHK od AfGcHK separována pomocí SDS-PAGE-Phos-tag. Z intenzit pruhů bylo vypočítáno látkové množství P-AfGcHK, které vzniklo z 11,6 pmol AfGcHK. Z této hodnoty byla poté zjištěna hodnota počáteční rychlosti enzymové reakce

Konzentrace ATP [µM]	0,0	5,0	10,0	25,0	50,0	75,0	100,0
v₀ [pmol P-AfGcHK.min⁻¹.µl⁻¹]	0,0	2,2	4,0	6,0	6,2	7,4	8,2
Konzentrace ATP [µM]	150,0	200,0	300,0	400,0	600,0	800,0	1000,0
v₀ [pmol P-AfGcHK.min⁻¹.µl⁻¹]	8,6	9,8	9,8	9,6	9,8	9,6	9,2



Obrázek 44: Závislost autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP

Autofosforylační reakce byla zahájena přidavkem ATP o příslušné koncentraci do reakční směsi (osa x). Po ukončení reakce byla P-AfGcHK od AfGcHK separována pomocí SDS-PAGE-Phos-tag. Z intenzit pruhů bylo vypočítáno látkové množství P-AfGcHK, které vzniklo z 11,6 pmol AfGcHK. Z této hodnoty byla poté zjištěna hodnota počáteční rychlosti enzymové reakce (osa y). Výslednými body byla proložena hyperbola, kterou popisuje funkce Michaelise a Mentenové [134].



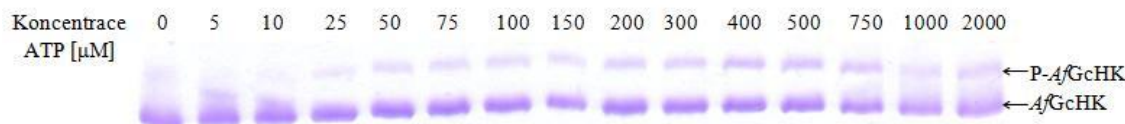
Obrázek 45: Dvojitý reciproký výnos závislosti počáteční rychlosti autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP

V oblasti grafu je uvedena regresní rovnice, která byla použita k výpočtu K_m a V_{max} .

4.7.2 Studium závislosti autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP v nepřítomnosti hořčnatých kationtů

Bylo studováno, jak se změní kinetické parametry autofosforylační reakce AfGcHK, pokud v reakční směsi nebudou přítomny hořčnaté kationty. Složení reakční směsi a podmínky reakce jsou uvedeny v kapitole 3.3.15.2, strana 62. Reakce byla zahájena přidavkem ATP o příslušné výsledné koncentraci a probíhala 1 minutu. Bylo ověřeno, že v tomto časovém intervalu probíhá daná enzymová reakce počáteční rychlostí. Po ukončení reakce byly vzorky analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE-Phos-tag. Jak je patrné z obrázku 46, strana 93, u vzorku, kdy koncentrace ATP v reakční směsi byla 5 μM, došlo vlivem difúze k rozmytí dané zóny a vyhodnocení intenzity tohoto pruhu tak bylo zatíženo příliš velkou chybou. Výsledek autofosforylační reakce s 5 μM ATP jako substrátem tak nebyl zahrnut do výpočtů kinetických parametrů. Dle postupu popsaného v kapitole 3.3.17, strana 63 byla vypočítána hodnota počáteční rychlosti enzymové reakce. Tyto hodnoty pro jednotlivé koncentrace ATP jsou zobrazeny v tabulce 5, strana 93. Kinetika autofosforylační reakce AfGcHK v nepřítomnosti hořčnatých kationtů odpovídá průběhu funkce popisující kinetiku enzymových reakcí dle Michaelise a Mentenové (obrázek 47, strana 94) [134], bylo proto přistoupeno k určení kinetických parametrů pomocí Lineaweaver-Burkova výnosu (obrázek 48, strana 94) [132]. Hodnota

Michaelisovy konstanty autofosforylační reakce AfGcHK bez přítomnosti hořčičných kationtů vzhledem k ATP je 66 μM a hodnota maximální rychlosti reakce vzhledem k ATP je 2 $\text{pmol P-AfGcHK}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.



Obrázek 46: Závislost autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP v nepřítomnosti hořčičných kationtů

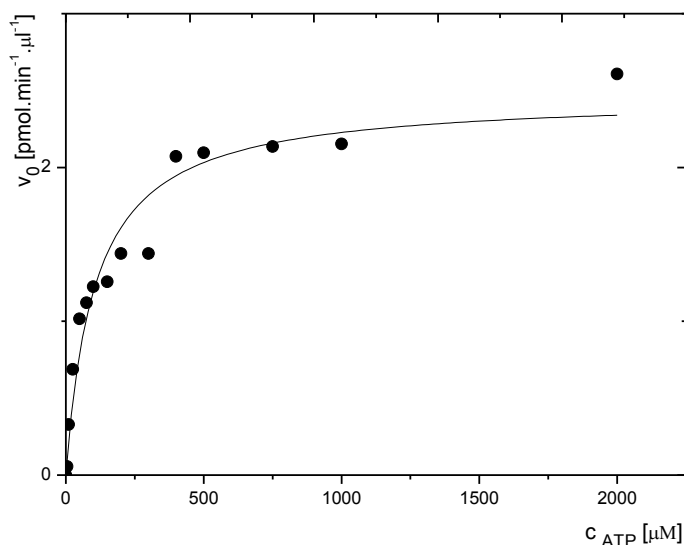
Čísla označují koncentraci ATP ve výsledné reakční směsi obsahující 50 mM Tris-HCl, 50 mM chlorid draselný, 10 μM AfGcHK.

Pro SDS-PAGE-Phos-tag byl použit 10% separační gel, 75 μM Phos-tag a 200 μM chlorid manganatý.

Tabulka 5: Závislost autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP v nepřítomnosti hořčičných kationtů

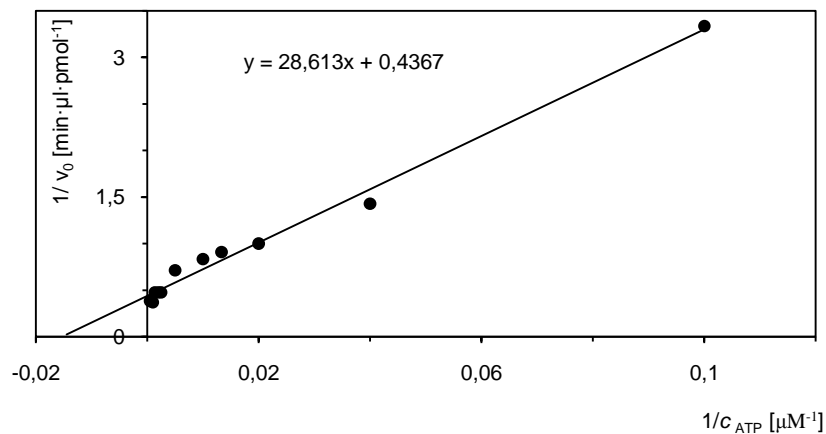
Autofosforylační reakce byla zahájena přidávkem ATP o příslušné koncentraci do reakční směsi. Po ukončení reakce byla P-AfGcHK od AfGcHK separována pomocí SDS-PAGE-Phos-tag. Z intenzit pruhů bylo vypočítáno látkové množství P-AfGcHK, které vzniklo z 11,6 pmol AfGcHK. Z této hodnoty byla poté zjištěna hodnota počáteční rychlosti enzymové reakce.

Koncentrace ATP [μM]	0,0	5,0	10,0	15,0	25,0	50,0	75,0
v_0 [$\text{pmol P-AfGcHK}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]	0,0	0,1	0,3	0,7	1,0	1,1	1,2
Koncentrace ATP [μM]	150,0	300,0	400,0	500,0	750,0	1000,0	2000,0
v_0 [$\text{pmol P-AfGcHK}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]	1,4	1,4	2,1	2,1	2,1	2,2	2,6



Obrázek 47: Závislost počáteční rychlosti autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP v nepřítomnosti hořčičných kationtů

Autofosforylační reakce byla zahájena přidáním ATP o příslušné koncentraci do reakční směsi (osa x). Po ukončení reakce byla P-AfGcHK od AfGcHK separována pomocí SDS-PAGE-Phos-tag. Z intenzit pruhů bylo vypočítáno látkové množství P-AfGcHK, které vzniklo z 11,6 pmol AfGcHK. Z této hodnoty byla poté zjištěna hodnota počáteční rychlosti enzymové reakce (osa y). Výslednými body byla proložena hyperbola, kterou popisuje funkce Michaelise a Mentenové [134].

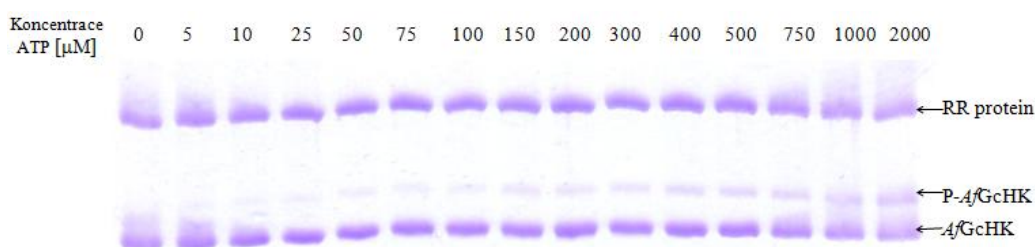


Obrázek 48: Dvojitý reciproký výnos závislosti počáteční rychlosti autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP v nepřítomnosti hořčičných kationtů

V oblasti grafu je uvedena regresní rovnice, která byla použita k výpočtu K_m a V_{max} .

4.7.3 Studium závislosti autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP v přítomnosti RR proteinu a v nepřítomnosti hořečnatých kationtů

V předchozích experimentech bylo zjištěno, že RR protein v nepřítomnosti hořečnatých kationtů nemá fosfatasovou, ani autofosforylační aktivitu (kapitola 4.6.2, strana 80). Bylo proto zkoumáno, jestli přítomnost RR proteinu ovlivní kinetické parametry autofosforylační reakce AfGcHK v nepřítomnosti hořečnatých kationtů (kinetické parametry autofosforylační reakce AfGcHK v nepřítomnosti hořečnatých kationtů byly získány v kapitole 4.7.2, strana 92). Složení inkubačních směsí a podmínky reakce jsou uvedeny v kapitole 3.3.15.3, strana 63). Reakce byla zahájena přidáním ATP o příslušné výsledné koncentraci a probíhala 1 minutu. Bylo ověřeno, že v tomto časovém intervalu probíhá daná enzymová reakce počáteční rychlostí. Po ukončení reakce byly vzorky analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE-Phos-tag (obrázek 49). Dle postupu popsaného v kapitole 3.3.17, strana 63 byla vypočítána hodnota počáteční rychlosti enzymové reakce. Tyto hodnoty pro jednotlivé koncentrace jsou zobrazeny v tabulce 6, strana 96. Kinetika autofosforylační reakce AfGcHK v přítomnosti RR proteinu a v nepřítomnosti hořečnatých kationtů odpovídá průběhu kinetiky Michaelise a Mentenové (obrázek 50, strana 96) [134]. Pro určení kinetických parametrů AfGcHK pomocí Lineaweaver-Burkova výnosu [132] byly zanedbány hodnoty počáteční rychlosti tvorby P-AfGcHK, v inkubacích s 5 μM , 10 μM a 25 μM ATP (obrázek 51, strana 97). Pomocí získané regresní rovnice byla stanovena hodnota Michaelisovy konstanty autofosforylační reakce AfGcHK v přítomnosti RR proteinu bez přítomnosti hořečnatých kationtů vzhledem k ATP a hodnota maximální rychlosti reakce vzhledem k ATP. Tyto hodnoty jsou rovny 152 μM , respektive 2 $\text{pmol P-AfGcHK}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.



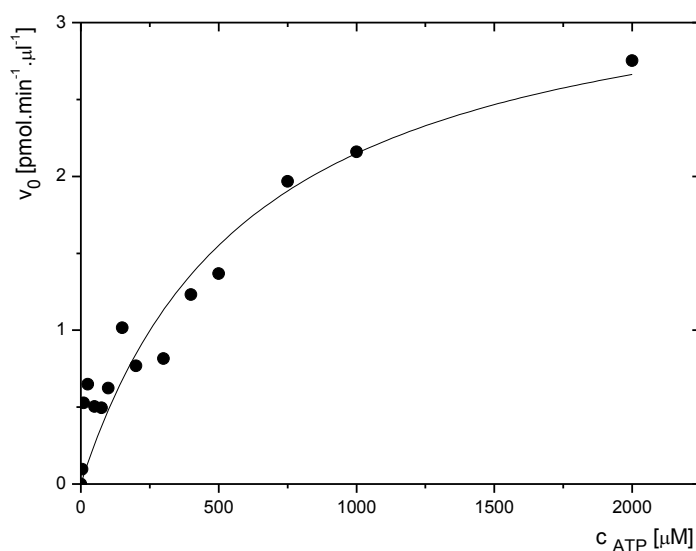
Obrázek 49: Závislost autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP v přítomnosti RR proteinu a v nepřítomnosti hořečnatých kationtů

Čísla označují koncentraci ATP ve výsledné reakční směsi obsahující 50 mM Tris-HCl, 50 mM chlorid draselný, 10 μM AfGcHK, 10 μM RR protein. Pro SDS-PAGE-Phos-tag byl použit 10% separační gel, 75 μM Phos-tag a 200 μM chlorid manganatý.

Tabulka 6: Závislost autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP v přítomnosti RR proteinu a v nepřítomnosti hořečnatých kationtů

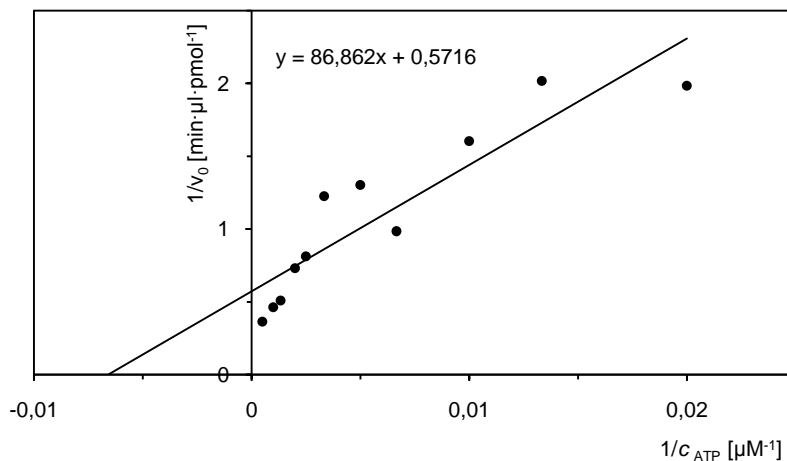
Autofosforylační reakce byla zahájena přidavkem ATP o příslušné koncentraci do reakční směsi. Po ukončení reakce byla P-AfGcHK od AfGcHK separována pomocí SDS-PAGE-Phos-tag. Z intenzit pruhů bylo vypočítáno látkové množství P-AfGcHK, které vzniklo z 11, 6 pmol AfGcHK. Z této hodnoty byla poté zjištěna hodnota počáteční rychlosti enzymové reakce.

Koncentrace ATP [μM]	0,0	5,0	10,0	25,0	50,0	75,0	100,0	150,0
v_0 [pmol P-AfGcHK.min⁻¹.μl^{-1}]	0,0	0,1	0,5	0,6	0,5	0,5	0,6	1,0
Koncentrace ATP [μM]	200,0	300,0	400,0	500,0	750,0	1000,0	2000,0	
v_0 [pmol P-AfGcHK.min⁻¹.μl^{-1}]	0,8	0,8	1,2	1,4	2,0	2,2	2,8	



Obrázek 50: Závislost počáteční rychlosti autofosforylace P-AfGcHK na koncentraci ATP v přítomnosti RR proteinu a v nepřítomnosti hořečnatých kationtů

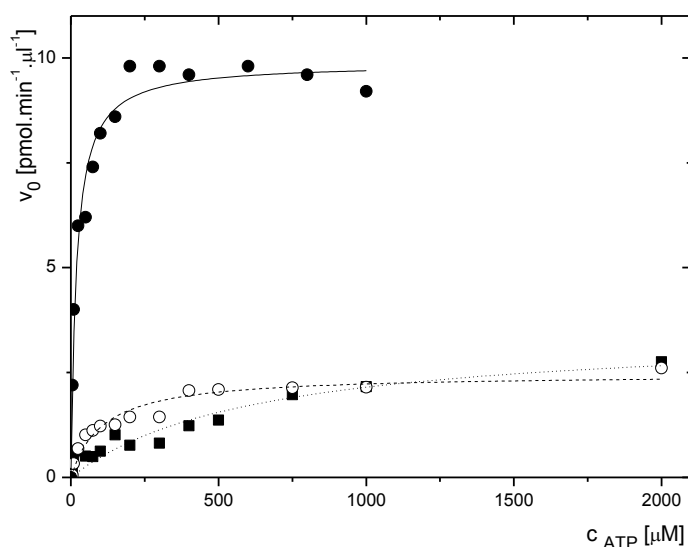
Autofosforylační reakce byla zahájena přidavkem ATP o příslušné koncentraci do reakční směsi (osa x). Po ukončení reakce byla P-AfGcHK od AfGcHK separována pomocí SDS-PAGE-Phos-tag. Z intenzit pruhů bylo vypočítáno látkové množství P-AfGcHK, které vzniklo z 11, 6 pmol AfGcHK. Z této hodnoty byla poté zjištěna hodnota počáteční rychlosti enzymové reakce (osa y). Výslednými body byla proložena hyperbola, kterou popisuje funkce Michaelise a Mentenové [134].



Obrázek 51: Stanovení kinetických parametrů autofosforylační reakce v přítomnosti RR proteinu a v nepřítomnosti hořečnatých iontů

V oblasti grafu je uvedena regresní rovnice, která byla použita k výpočtu K_m a V_{max} .

Pro větší názornost byl vytvořen graf, na jehož ose x je vynesena koncentrace ATP v reakční směsi a na ose y je vynesena hodnota počáteční rychlosti autofosforylační enzymové reakce AfGcHK za různých podmínek popsaných v kapitolách 4.7.1, strana 90, 4.7.2, strana 92 a 4.7.3, strana 95. To znamená za přítomnosti hořečnatých kationtů a nepřítomnosti RR proteinu (obrázek 52, plný kroužek, strana 98), za nepřítomnosti hořečnatých kationtů a nepřítomnosti RR proteinu (obrázek 52, prázdný kroužek, strana 98) a konečně za nepřítomnosti hořečnatých kationtů a přítomnosti RR proteinu (obrázek 52, plný čtvereček, strana 98).



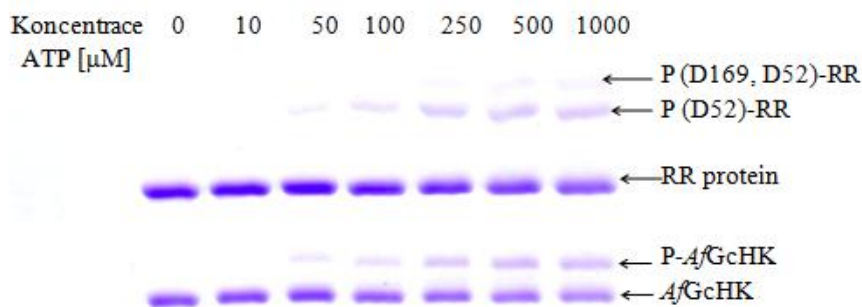
Obrázek 52: Závislost autofosforylace AfGcHK na ATP za různých podmínek

Plný kroužek a plná křivka značí výsledky studia závislosti autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP v přítomnosti hořečnatých kationtů. Prázdný kroužek a čariovavá křivka značí výsledky studia závislosti autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP v nepřítomnosti hořečnatých kationtů. Plný čtvereček a tečkovaná křivka značí výsledky studia závislosti autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP v přítomnosti RR proteinu a v nepřítomnosti hořečnatých kationtů.

Výslednými body byla proložena hyperbola, kterou popisuje funkce Michaelise a Mentenové [134].

4.8 Studium závislosti autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP v přítomnosti jak hořečnatých kationtů tak v přítomnosti RR proteinu

Složení reakční směsi a podmínky reakce, ve které byla studována závislost závislost autofosforylace AfGcHK v přítomnosti jak hořečnatých kationtů tak v přítomnosti RR proteinu na koncentraci ATP je popsáno v kapitole 3.3.16.1, strana 63. Reakce byla zahájena přidavkem ATP a byla ukončena po 1 minutě. Vzorčky byly analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE-Phos-tag (obrázek 53, strana 99). Po zahájení reakce je autofosforylován AfGcHK (obrázek 54, strana 99), tvoří se P-AfGcHK a protože jsou přítomny hořečnaté kationty, tak zároveň probíhá fosfotrasferová reakce na RR protein (obrázek 53, strana 99) a pravděpodobně také fosfatasová reakce (viz závěr kapitoly 4.6.2, strana 81). Dochází tak ke kompetici několika procesů. Tento jev komplikuje stanovení hodnoty Michaelisovy konstanty a maximální rychlosti autofosforylační reakce AfGcHK za těchto podmínek. Aby bylo možné tyto parametry stanovit, bylo by třeba provést analogický experiment s mutantem RR proteinu, který neobsahuje fosforylační místa a zamezit tak jak autofosforylaci RR proteinu, tak fosfatasové aktivitě RR proteinu.

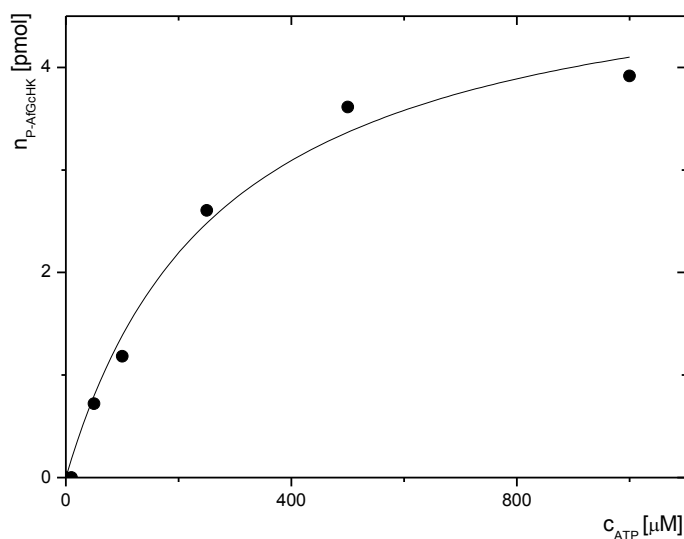


Obrázek 53: Závislost autofosforylace AfGcHK na koncentraci ATP v přítomnosti hořečnatých kationtů a RR proteinu

Čísla znázorňují koncentraci ATP ve výsledné reakční směsi obsahující 50 mM Tris-HCl, 50 mM chlorid draselný, 5 mM chlorid hořečnatý, 10 μM AfGcHK, 10 μM RR protein.

Jednotlivé fosforylované formy RR proteinu byly označeny analogicky s jejich mobilitou publikovanou v práci [110].

Pro SDS-PAGE-Phos-tag byl použit 10% separační gel, 75 μM Phos-tag, 200 μM chlorid manganatý.



Obrázek 54: Závislost autofosforylace AfGcHK v přítomnosti RR proteinu a hořečnatých kationtů na koncentraci ATP

Autofosforylační reakce byla zahájena přidávkem ATP o příslušné koncentraci do reakční směsi (osa x). Po ukončení reakce byla P-AfGcHK od AfGcHK separována pomocí SDS-PAGE-Phos-tag. Z intenzit pruhů bylo vypočítáno látkové množství P-AfGcHK, které vzniklo z 11,6 pmol AfGcHK

5 Diskuze

K dosažení cílů definovaných na začátku řešení dané diplomové práce bylo nezbytné nejprve vyprodukovat studované proteiny AfGcHK a RR protein heterologní expresí v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) a následně je z těchto buněk izolovat v dostatečné čistotě z těchto buněk. Byla provedena optimalizace protokolu heterologní exprese a izolačního postupu AfGcHK za účelem získání proteinu AfGcHK v jeho holoformě. V průběhu heterologní exprese proteinů detekujících kyslík, jakým je například YddV, je k buňkám současně s IPTG přidáván prekurzor syntézy hemu – δ -ALA [135]. Tím dochází k expresi proteinu s inkorporovaným hemem. Tento postup se však pro získání holoformy AfGcHK ukázal jako neefektivní. Zatímco protein YddV je po přidavku IPTG exprimován v malé míře a buňky *E. coli* efektivně využijí prekurzor hemu k jeho zvýšené syntéze a posléze k optimální inkorporaci hemu do nově exprimovaných proteinů, exprese proteinu AfGcHK je až o několik řádů intenzivnější. Ani nejvyšší koncentrace δ -ALA, kterou je z ekonomických důvodů ještě možné v průběhu heterologní exprese použít, nezajistila dostatečnou syntézu hemu v použitých buňkách. Tímto postupem bylo získáno pouze 0,11 % holoformy AfGcHK, protože exprese proteinu byla o několik řádů intenzivnější než syntéza hemu, přestože byly buňky saturovány prekurzorem jeho syntézy. Protože vyšší koncentrace prekurzoru hemu již nebylo možné použít a navíc se ani tento přístup nezdál být efektivní, bylo přistoupeno k následujícímu protokolu. AfGcHK byl exprimován bez přidavku δ -ALA a během izolačního postupu byla apoforma AfGcHK rekonstituována dodaným hemem. Při použití tohoto protokolu je nezbytně nutné zajistit, aby byl veškerý přebytečný nespecificky vázaný hem z izolovaného preparátu odstraněn. Tento požadavek je částečně realizován pomocí afinitní chromatografie. I přes toto opatření bylo ve výsledném preparátu obsaženo přibližně 17 % hemu, který byl k AfGcHK koordinován nespecificky. Je ale velmi pravděpodobné, že získané procentuální zastoupení hemu v daném proteinu (117 %) je zatíženo nepřesností stanovení proteinu metodou využívající bicinchoninovou kyselinu a také metodou detekce hemu (pyridin-hemochromová metoda). Nepřesnost obou metod odhaduji přibližně na 5 až 10 %. Z důvodů eliminace rizika přítomnosti frakce nespecificky vázaných molekul hemu, byl izolační postup rozšířen o poslední krok představovaný gelovou filtrační chromatografií. Porovnáním výsledků spektrální analýzy (zejména pozice Soretova pásu holoformy AfGcHK) s výsledky popsány v pilotní publikaci bylo potvrzeno, že hem je k proteinu AfGcHK koordinován

analogicky jako v této studii tj. koordinací iontu železa k proximálnímu histidinu [110]. Byla tedy získána holoforma AfGcHK vykazující více než 95% homogenitu. Tento preparát byl vhodný pro další experimenty. Heterologní exprese RR proteinu v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) a jeho následná izolace z těchto buněk byla rovněž úspěšná, byl získán RR protein vykazující více než 95% homogenitu. Nebylo tak třeba expresní ani izolační protokol navržený v publikaci [110] optimalizovat.

Stěžejním cílem předkládané diplomové práce bylo studium mechanismu autofosforylační reakce AfGcHK a fosforylační reakce RR proteinu a následné stanovení kinetických parametrů studovaných enzymových reakcí. Pro detekci fosforylovaných forem proteinů se standardně aplikuje metoda využívající speciálně radioaktivně značený fosfátový zbytek, který je předmětem studované enzymové reakce [37]. Tato metoda s sebou však nese zdravotní rizika pro obsluhující personál a není možné ji tedy zavést do jakékoliv laboratoře, protože pro nakládání s radioaktivním materiálem je třeba mít speciální povolení. Dalším hojně využívaným přístupem pro studium kinas je použití specifické protilátky proti fosforylované a nefosforylované formě proteinu [113]. Takové protilátky však v laboratoři nebyly během studia enzymové aktivity AfGcHK a RR proteinu k dispozici. Pro účely studia AfGcHK a RR proteinu se jevila jako optimální metoda SDS-PAGE-Phos-tag [116]. Výhodou této metody je eliminace práce s radioaktivním materiálem, nezávislost na kvalitě připravovaných protilátek, jednoduchá manipulace a možnost paralelně analyzovat až 15 vzorků. Protože tato sloučenina je na trhu dostupná pouze několik let a neexistuje tak mnoho studií, v nichž byla použita, bylo nejprve nezbytně nutné SDS-PAGE-Phos-tag metodu optimalizovat pro účely studia autofosforylační reakce AfGcHK a fosforylační reakce RR proteinu. Během procesu optimalizace bylo zjištěno, že fosforylovaný RR protein je velmi nestabilní a snadno dochází k jeho defosforylaci. Fosforylačními místy RR proteinu jsou Asp52 a Asp169 [110]. A právě vazba mezi fosfátovým zbytkem a aspartátovou kyselinou je velmi labilní [136]. AfGcHK je autofosforylován na His183 [110], vazba mezi histidinem a fosfátovým zbytkem je stabilnější než acylfosfátová vazba aspartátové kyseliny. I přes to je však méně stabilní, než vazba mezi fosfátovým zbytkem a volnou OH skupinou aminokyselin serin, threonin, tyrosin [113]. Právě na serin, threonin a tyrosin se nejčastěji přenáší fosfátový zbytek v rámci regulačních mechanismů eukaryotních organismů [137]. Hydrolýza acylfosfátové vazby aspartátové kyseliny je podpořena vystavením P-RR proteinu vyšším teplotám [117]. Tento fakt byl experimentálně ověřen. Zatímco AfGcHK vykazoval

autofosforylační aktivitu i při teplotě 60 °C (obrázek 19, strana 70), fosforylace RR proteinu byla zcela potlačena při teplotách vyšších než 37 °C (obrázek 26, strana 75). Pokud nebylo možné analyzovat fosforylovaný RR protein bezprostředně po fosforylační reakci, bylo nutné uchovávat ho při teplotě nižší než 0 °C. Nicméně v naprosté většině experimentů této diplomové práce byl fosforylovaný RR protein analyzován bezprostředně po fosforylační reakci.

Analýzou AfGcHK bez dodaného ATP pomocí SDS-PAGE-Phos-tag bylo zjištěno, že přibližně 5 % AfGcHK se vyskytuje ve formě P-AfGcHK (obrázek 28, strana 76). Toto bazální množství P-AfGcHK mohlo být vytvořeno během heterologní exprese regulačními pochody bakterie *E. coli*. Pravděpodobnější je možnost, že během izolace AfGcHK z buněk *E. coli* BL-21(DE3) mohlo v proteinovém preparátu zůstat stopové množství ATP. Jakmile byl k takovému preparátu AfGcHK přidán pufr, který svým složením a přítomností hořčičných kationtů vytváří optimální prostředí pro průběh autofosforylační reakce, došlo k pozorované 5% autofosforylaci AfGcHK. Při inkubaci AfGcHK s ATP v reálném čase nikdy nebyla získána 100% forma P-AfGcHK (obrázek 21, strana 72). Již v 5 minutě probíhající enzymové reakce dochází k saturaci enzymu substrátem (ATP), AfGcHK je však autofosforylován přibližně ze 70 %. Tento jev může být způsoben tím, že zároveň s fosforylací AfGcHK probíhá defosforylace P-AfGcHK a v průběhu reakce se ustálí rovnováha fosforylačního a defosforylačního procesu. Další možností je inhibice enzymové reakce vzniklým produktem. Nelze také opomenout možnost, že i přes zavedená opatření (nízká koncentrace proteinu, uchování proteinu v pufru s vyšší iontovou silou, použití gelové filtrační chromatografie), určitá část AfGcHK byla získána v neaktivní formě [138]. Takový inaktivní protein zcela ztrácí schopnost autofosforylace.

Překvapivým zjištěním byla vysoká hodnota pH optima (přibližně 11, obrázek 23, strana 73) autofosforylační aktivity AfGcHK. Nárůst bakteriálních kolonií *Anaeromyxobacter sp.*, kmen Fw 109-5 je pozorovatelný při pH 4,0 – 9,0 [139]. Hodnota pH optima se tak neshoduje s hodnotou pH, při které AfGcHK funguje v daném organismu. Vliv pH proto může být nástrojem regulace enzymové autofosforylační aktivity AfGcHK. Protože hodnota pH 11 je značně nefyziologická, byla aktivita AfGcHK studována při pH 8, které bylo navíc také použito v předchozích studiích [110]. Dalším neopomenutelným důvodem pro výběr pH 8 je fakt, že fosforylační aktivita RR proteinu je při pH 11 naopak značně potlačena. Nebylo by proto možné porovnávat hodnoty kinetických parametrů získané reakcemi v prostředí o odlišných pH a navíc je třeba definovat podmínky, ve

kterých je možné studovat oba procesy paralelně. Bylo proto zvoleno pH 8, které je optimální pro fosforylaci RR proteinu a zároveň je při tomto pH autokinasová reakce dostatečně aktivní.

V literatuře je popsáno několik HK, např. CheA, HK853 a EnvZ, jejichž autofosforylační aktivita je podmíněna přítomností hořečnatých kationtů v reakční směsi [140, 141]. CA doména výše zmíněných HK obsahuje konzervovaný asparaginový zbytek chelatující hořečnatý kationt, který vyrovnává negativní parciální náboj navázaného ATP [142]. Esenciální hořečnaté kationty tak hrají klíčovou roli ve stabilizaci přechodného stavu HK. Bylo proto očekáváno, že bez dodání hořečnatých kationtů do reakční směsi bude autofosforylační aktivita *AfGcHK* zcela potlačena. Navzdory tomuto očekávání byl však *AfGcHK* po přidavku ATP bez hořečnatých kationtů autofosforylován. V porovnání se situací, kdy jsou v reakční směsi přítomny hořečnaté kationty, však autofosforylační reakce bez hořečnatých kationtů probíhala s nižší rychlostí. Naproti tomu v absenci hořečnatých kationtů nedocházelo ani za účasti ATP k fosforylaci RR proteinu. Protože zatím není známo prostorové uspořádání ani *AfGcHK* ani studovaného RR proteinu, nelze plně vysvětlit význam hořečnatých kationtů pro fosforylaci RR proteinu. V literatuře jsou však popsány příklady, kdy přítomnost dvojmocných kationtů v negativně nabitě aspartátové kapse byla pro fosforylaci RR proteinu klíčová [42, 52, 143]. Je tak velmi pravděpodobné, že hořečnaté kationty jsou vázány do blízkosti aktivního místa studovaného RR proteinu a pomáhají tak stabilizovat jeho přechodný stav pro fosforylaci.

Dále bylo sledováno, jak studované reakce ovlivní přítomnost vápenatých kationtů namísto hořečnatých. Pokud probíhala autofosforylační, respektive fosforylační reakce dostatečně dlouho (tj. alespoň 5 minut) došlo vlivem vápenatých kationtů k nárůstu fosforylovaných forem RR proteinu a *P-AfGcHK*. Toto zjištění je v pozitivní korelaci s objevem, kdy v krystalových strukturách RR proteinů CheY a Spo0F, obsadil vápenatý kationt stejnou pozici jako hořečnatý kationt [144]. Zdá se tedy, že vápenaté kationty mohou alespoň částečně nahradit kationty hořečnaté. Zajímavé však je, že po 1 minutě inkubace *AfGcHK* s ATP bez hořečnatých kationtů došlo k zřetelnému nárůstu *P-AfGcHK*, zatímco při použití vápenatých kationtů je vzniklé množství *P-AfGcHK* za stejnou jednotku času zanedbatelné. Vazba vápenatých kationtů tak zřejmě podporuje fosfatasovou aktivitu ať už *AfGcHK* nebo RR proteinu. Během krátkého trvání reakce je pak rovnováha ovlivněna ve prospěch defosforylační reakce.

Pro objasnění mechanismu studovaného dvousložkového signálního systému bylo vhodné charakterizovat samostatně proces autofosforylace *AfGcHK* a proces fosforylace RR proteinu. Tento úkol byl poměrně jednoduše realizovatelný pro studium fosforylačního procesu *AfGcHK*. Pokud v reakční směsi byl přítomen pouze *AfGcHK*, došlo po přidavku ATP k autofosforylaci *AfGcHK*. Tímto experimentem byl potvrzen předpoklad, že *AfGcHK* je enzymem, který je v přítomnosti ATP schopen autofosforylace. Toto zjištění je ve shodě s daty popsány v publikaci [110]. Naproti tomu charakterizace fosforylačního procesu RR proteinu byla mnohem komplikovanější. Bez přítomnosti P-*AfGcHK* v reakční směsi RR protein není fosforylován. Po zahájení reakce přidavkem ATP však dochází zároveň k autofosforylaci *AfGcHK* i fosforylaci RR proteinu. Byly proto hledány způsoby, jak kompetující autofosforylační proces *AfGcHK* odstranit. Za tímto účelem byl separován protein P-*AfGcHK* od *AfGcHK* pomocí iontově výměnné chromatografie. Bohužel stupeň interakce P-*AfGcHK* a *AfGcHK* s chromatografickou kolonou byl velmi podobný, a proto se nepodařilo fosforylovanou a nefosforylovanou formu oddělit. Ze směsi *AfGcHK* a P-*AfGcHK* byly proto pomocí gelové filtrační chromatografie alespoň odstraněny nukleotidy (ATP, ADP) a hořečnaté kationty. Získaný preparát tak obsahoval pouze přibližně 30 % *AfGcHK* a 70 % P-*AfGcHK* a byl prost ATP a hořečnatých kationtů. V případě, kdy k této získané směsi nebylo dodáno ATP a hořečnaté kationty, nedošlo k fosforylaci RR proteinu. Tento výsledek je v souladu s výše popsaným tvrzením, že pro přenos fosfátové skupiny na RR protein, je nutné stabilizovat přechodnou strukturu RR proteinu použitím hořečnatých kationtů (viz diskuze výše). Přidavkem hořečnatých kationtů k získané směsi nebyl pozorován fosfotransfer z P-*AfGcHK* na RR protein. Naopak vlivem hořečnatých kationtů byla podpořena defosforylace P-*AfGcHK*. Je otázkou, zda došlo k přenosu fosfátové skupiny z P-*AfGcHK* na RR protein a poté k defosforylaci RR proteinu vlivem enzymové aktivity buď *AfGcHK* nebo RR proteinu. Další možností je, že RR protein je enzymem, který má defosforylační aktivitu vůči P-*AfGcHK* a pokud je v reakční směsi přítomno ATP, převládá nad touto defosforylační aktivitou autofosforylační aktivita *AfGcHK*. Nelze opomenout ani eventualitu, že *AfGcHK* může mít zároveň autofosforylační i fosfatasovou aktivitu. V nepřítomnosti substrátu (ATP) je pak rovnováha ovlivněna ve prospěch fosfatasové aktivity. Tuto myšlenku bylo jednoduché experimentálně ověřit. Směs *AfGcHK* a P-*AfGcHK* prostá nukleotidů a hořečnatých kationtů byla inkubována v reakčním pufru a analyzována pomocí SDS-PAGE-Phos-tag. Zároveň byla analyzována tato směs po inkubaci s hořečnatými kationty. Tímto bylo potvrzeno, že *AfGcHK*

fosfatasovou aktivitu vůči P-*AfGcHK* nemá. Inkubací směsí *AfGcHK* a P-*AfGcHK* prosté nukleotidů a hořečnatých kationtů s RR proteinem a vápenatými kationty byla defosforylace P-*AfGcHK* částečně potlačena, zároveň také došlo k fosforylaci RR proteinu. Stupeň fosforylace nebyl tak intenzivní, jako při inkubaci s *AfGcHK*, hořečnatými kationty a ATP, nicméně bylo prokázáno, že i v nepřítomnosti ATP dochází k přenosu fosfátového zbytku z P-*AfGcHK* na RR protein. Fosfatasová aktivita je potlačena přítomností ATP a hořečnatých kationtů, kdy navíc dochází také k masivní fosforylaci RR proteinu. Stejného efektu nebylo dosaženo použitím ATP^A namísto ATP. Protože modifikace (nahrazení kyslíkového atomu mezi γ a β fosfátovými skupinami imidovou skupinou) zabraňuje hydrolýze ATP^A [129, 145], je pravděpodobné, že pro proces fosforylace RR proteinu je hydrolýza ATP nezbytná. Žádným z provedených experimentů však nebyla vyřešena otázka, zda *AfGcHK* má fosforylační aktivitu také vůči RR proteinu nebo je fosforylace RR proteinu způsobená autofosforylační aktivitou RR proteinu, kdy P-*AfGcHK* je přímým substrátem. Pokud by se však podařilo nalézt jiný substrát (resp. donor fosfátu) než P-*AfGcHK*, byla by potvrzena teorie o autofosforylační enzymové aktivitě RR. Bylo proto přistoupeno k testování vlivu nízkomolekulárních donorů fosfátu na stupeň fosforylace RR proteinu.

Literární poznatky ukazují, že vybrané RR proteiny mohou jako substráty pro svou fosforylaci využívat mnohé nízkomolekulární donory fosfátu [38]. Byly proto testovány látky, které byly popsány jako substráty jiných RR proteinů – acetylfosfát [37], fosforamidát [38] a také látky, které byly předmětem studia jako potenciální donory fosfátové skupiny RR proteinu NRI – fosfoenolpyruvát a ATP [38]. Fosfoenolpyruvát ani samostatné ATP (tedy bez přítomnosti *AfGcHK*) nebyly vhodnými substráty pro autofosforylační reakci RR proteinu (obrázek 34, strana 83). Toto pozorování se shodovalo s efektem těchto látek na autofosforylaci RR proteinu NRI, který byl prokazatelně autofosforylován po přidavku jiných donorů fosfátové skupiny - acetylfosfátu nebo fosforamidátu [38]. Acetylfosfát, jehož prostřednictvím dochází k autofosforylaci mnohých RR proteinů jako např. CheY [37], NRI [38], BvgA [39], OmpR [40] nebyl vhodným substrátem pro autofosforylační reakci studovaného RR proteinu (obrázek 36, strana 85). Poslední testovanou látkou byl fosforamidát, který je vhodným substrátem pro autofosforylační reakce katalyzované např. Spo0F [42], CheB [37]. Protože na autofosforylační reakci při použití nízkomolekulárních donorů fosfátu jako substrátu může mít vliv také pH prostředí [146], bylo nutné tento fakt zohlednit. Optimální pH pro průběh

autofosforylační reakce RR proteinu za účasti různých fosfodonorů však nelze generalizovat. Také je třeba přihlížet k faktu, že k nejefektivnější fosforylaci RR proteinu ve směsi s *A/GcHK* a ATP dochází při pH 8 a jak snížení, tak zvýšení pH vedlo k potlačení fosforylace. Z literárních poznatků vyplývá, že inkubační doba působení fosfodonoru na různé RR proteiny, nutná pro autofosforylaci RR proteinu se pohybuje od desítek sekund po stovky minut [37, 147]. Bylo nutné zohlednit také možnost, že RR protein má vůči své fosforylované formě fosfatasovou aktivitu, která je podpořena přítomností hořčnatých kationtů. Bylo prokázáno, že fosforamidát je substrátem pro fosforylaci RR proteinu, nicméně bylo třeba extrémně dlouhého inkubačního času a také výrazného nadbytku fosforamidátu. Zdá se tedy, že RR protein katalyzuje svoji vlastní autofosforylaci. Stejně jako *CheB* [37] nebo *Spo0F* [42], studovaný RR protein nevyužívá jako substrát acetylfosfát, ale využívá N-fosfátovou skupinu fosforamidátu. Je tedy vysoce pravděpodobné, že studovaný RR protein bude preferovat N-fosfátovou skupinu u svých fosfodonorů. Za zmínku stojí, že také fosfátová skupina *P-A/GcHK* je vázána na imidazolové jádro histidinu tedy jedná se také o N-fosfátovou vazbu. Zároveň bylo zjištěno, že pro tuto autofosforylaci RR proteinu fosforamidátem jako substrátem je, stejně jako při autofosforylační reakci RR proteinu za přítomnosti *P-A/GcHK*, nezbytně nutná přítomnost hořčnatých kationtů. Tento fakt je v souladu s tvrzením, že hořčnaté kationty stabilizují přechodnou strukturu RR proteinu [142]. Zároveň je třeba diskutovat vliv hořčnatých kationtů na fosfatasovou aktivitu RR proteinu. Z provedených experimentů vyplývá, že jak nepřítomnost hořčnatých kationtů, tak naopak jejich velký nadbytek potlačuje fosfatasovou aktivitu RR proteinu.

Z analýzy kinetických parametrů autofosforylace RR proteinu za přítomnosti hořčnatých kationtů a fosforamidátu vyplývá, že reakce vykazuje saturační průběh vůči hořčnatým kationtům. Navíc vysoká hodnota Michaelisovy konstanty pro fosforamidát jako substrát ukazuje na nízkou afinitu RR proteinu k této látce. Zdá se, že *P-A/GcHK* v přítomnosti ATP je pro fosforylační reakci RR proteinu mnohem lepším substrátem než fosforamidát. Nicméně kinetické parametry této druhé reakce nemohly být exaktně určeny v důsledku kompetice několika enzymových procesů. Tyto závěry jsou tedy učiněny na základě odhadu.

Z výše uvedených skutečností se zdá být pravděpodobné, že *P-A/GcHK* je substrátem pro autofosforylační reakci katalyzovanou RR proteinem. Nicméně stále nelze zcela vyloučit ani možnost, že *P-A/GcHK* může vyvolat konformační změnu RR proteinu a

tím se spolupodílet na enzymové reakci nebo že P-AfGcHK může poskytnout vazebný kontakt, který stabilizuje přechodný stav RR proteinu. Zároveň zůstává otázkou, jakou funkci při autofosforylační reakci RR proteinu za účasti P-AfGcHK jako substrátu zastává ATP. Pokud byl RR protein inkubován s fosforamidátem a zároveň ATP po dobu 1 minuty (tedy v krátkém časovém úseku kdy pravděpodobně nedochází k autofosforylaci RR proteinu), nedošlo k fosforylaci RR proteinu. Pokud však tato směs byla inkubována 180 minut, byl nárůst fosforylované formy RR proteinu přibližně o 20 % větší než při inkubaci RR proteinu s fosforamidátem bez ATP za stejných podmínek. Fosforylace RR proteinu, byla také vyvolána přidáním ATP k P-AfGcHK, AfGcHK a RR proteinu. Na základě těchto zjištění je možné se domnívat, že ATP (nikoliv však ATP^A) nějakým způsobem potlačuje defosforylaci RR proteinu, tj. jeho fosfatasovou aktivitu.

Až dosud jsem se věnovala diskusi týkající se mechanismu fosforylace RR proteinu. Nyní se zaměřím na mechanismus autofosforylační reakce AfGcHK. Jedná se o dvousubstrátovou reakci, kdy jedním substrátem je ATP a druhým je enzym sám. Autofosforylační aktivity jsou pro enzymy katalyzující kinasové reakce typické [11, 92, 114]. Vzhledem k tomuto faktu bylo možné studovat jen vliv změny koncentrace ATP na počáteční rychlost autofosforylační reakce AfGcHK. Koncentrace enzymu a tedy i druhého substrátu byla udržovaná konstantní.

Nejprve byl studován fyziologický případ autofosforylační aktivity AfGcHK v přítomnosti hořečnatých kationtů. Nízká hodnota Michaelisovy konstanty autofosforylační reakce AfGcHK vzhledem k ATP jako substrátu ukazuje na vysokou afinitu AfGcHK k ATP. Dále byly vytvořeny a studovány dva nefyziologické systémy, které neobsahovaly hořečnaté kationty. Z předchozích závěrů vyplývá, že hořečnaté kationty nejsou esenciální pro autofosforylaci AfGcHK. Nicméně bez nich neprobíhá fosforylace RR proteinu a tak je za těchto okolností možné studovat kinetické parametry autofosforylace AfGcHK v přítomnosti RR proteinu aniž by kompetovaly další procesy. Autofosforylační reakce v nepřítomnosti hořečnatých kationtů probíhá, nicméně afinita ATP k AfGcHK bez přítomnosti hořečnatých kationtů je podle očekávání nižší, než je tomu v přítomnosti hořečnatých kationtů (K_m v nepřítomnosti hořečnatých kationtů je 3,4 krát vyšší). Přibližně 4,5 krát nižší hodnota maximální rychlosti reakce, která probíhá bez přítomnosti hořečnatých kationtů je ukazatelem toho, že bez přítomnosti hořečnatých kationtů probíhá autofosforylační reakce AfGcHK pomaleji. Bylo tak jednoznačně potvrzeno, že přítomnost hořečnatých kationtů je důležitá pro efektivní autofosforylační

reakci. Přítomností RR proteinu došlo k nárůstu Michaelisovy konstanty autofosforylace *AfGcHK* oproti situaci bez RR proteinu přibližně 2,7 krát. Přítomnost RR proteinu tak snižuje afinitu *AfGcHK* k ATP. RR protein je tak zřejmě vázán do blízkosti vazebného místa pro ATP (popřípadě s ním interaguje), čímž dochází k narušení interakce *AfGcHK* a ATP a následně se tento proces projeví sníženou afinitou *AfGcHK* k ATP za přítomnosti RR proteinu. Maximální rychlost autofosforylace *AfGcHK* bez hořečnatých kationtů ať již za přítomnosti RR proteinu nebo bez RR proteinu, je vždy přibližně 5 krát nižší než maximální rychlost analogické reakce v přítomnosti hořečnatých kationtů. Problémem výše uvedených dvou nefyziologických systémů je však jejich značný odklon od přirozených podmínek daný nepřítomností hořečnatých kationtů. Proto je momentálně připravován mutant RR proteinu (D52A, D169A). Tento mutant RR proteinu nebude fosforylovatelný, čímž bude umožněno studovat autofosforylační reakci *AfGcHK* v přítomnosti mutovaného RR proteinu a zároveň v přítomnosti hořečnatých kationtů, aniž by docházelo ke kompetici několika procesů.

6 Závěr

Předkládaná diplomová práce se zabývá studiem dvousložkových signálních systémů, konkrétně proteinu detekujícího kyslík s globinovou strukturou senzorní domény AfGcHK a jeho příslušným RR proteinem. Stanovené cíle dané diplomové práce byly naplněny. Bylo dosaženo následujících výsledků:

- Byla provedena optimalizace protokolu heterologní exprese a izolačního postupu AfGcHK za účelem získání optimálně enzymově aktivního preparátu holo-AfGcHK. Bylo zjištěno, že je vhodné exprimovat AfGcHK bez přídavku δ -ALA a v průběhu izolačního postupu apoformu AfGcHK rekonstituovat s hemem. Byl také zařazen závěrečný krok izolace na principu gelové filtrační chromatografie. Bylo potvrzeno, že takto získaný preparát holo-AfGcHK dosahuje 95% homogenity.
- Také exprese RR proteinu v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) a jeho následná izolace z těchto buněk byla úspěšná. Získaný preparát dosahoval více než 95% homogenity.
- Bylo zjištěno, že pro nejefektivnější oddělení fosforylovaných forem proteinu AfGcHK a RR proteinu od příslušných nefosforylovaných forem pomocí metody SDS-PAGE-Phos-tag je nutné použít 10% separační gel, 75 μ M Phos-tag, 200 μ M chlorid manganatý a analyzovat maximálně 0,6 μ g proteinu v každé dráze.
- Byly nalezeny optimální podmínky pro průběh enzymových reakcí studovaných proteinů ve smyslu optimální teploty, doby inkubace i pH prostředí.
- Bylo prokázáno, že AfGcHK je enzymem, který má autofosforylační aktivitu. Hodnota Michaelisovy konstanty autofosforylační reakce AfGcHK vzhledem k ATP jako substrátu za přítomnosti hořčičných iontů je 18 μ M a hodnota maximální rychlosti autofosforylační reakce vzhledem k ATP je 10 pmol P-AfGcHK.min⁻¹. μ l⁻¹. Druhým substrátem této reakce je sám enzym a proto hodnoty parametrů vzhledem k druhému parametru nemohly být určeny.

- Hodnota Michaelisovy konstanty autofosforylační reakce *AfGcHK* bez přítomnosti hořečnatých kationtů vzhledem k ATP jako substrátu je 66 μM a hodnota maximální rychlosti vzhledem k ATP je 2 $\text{pmol P-AfGcHK}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Autofosforylační aktivita *AfGcHK* je tak jednoznačně podpořena přítomností hořečnatých kationtů, nicméně přítomnost těchto kationtů překvapivě není esenciální.
- RR protein je fosforylován v přítomnosti fosforamidátu, čímž byla prokázána jeho autofosforylační aktivita. Naproti tomu jako substráty pro svou autofosforylační reakci nevyužívá fosfoenolpyruvát, ATP v nepřítomnosti *AfGcHK*, nehydrolyzovatelný analog ATP ani acetylfosfát. Nejvýhodnějším substrátem pro autofosforylační reakci RR proteinu je P-*AfGcHK*. Autofosforylační aktivita RR proteinu je zcela závislá na přítomnosti hořečnatých kationtů, v případě jejich absence se proces úplně zastaví.
- Hodnota Michaelisovy konstanty autofosforylační reakce RR proteinu vzhledem k fosforamidátu jako substrátu je 65 mM, hodnota maximální rychlosti této reakce vzhledem k fosforamidátu je 0,02 $\text{pmol P-RR protein}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Druhým substrátem této reakce je sám enzym a proto hodnoty parametrů vzhledem k druhému parametru nemohly být určeny.
- Hodnota Michaelisovy konstanty autofosforylační reakce *AfGcHK* bez přítomnosti hořečnatých kationtů a v přítomnosti RR proteinu vzhledem k ATP jako substrátu je 152 μM a hodnota maximální rychlosti vzhledem k ATP je 2 $\text{pmol P-AfGcHK}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Přítomnost RR proteinu tak snižuje afinitu *AfGcHK* k ATP. Pravděpodobně RR protein interaguje s *AfGcHK* v okolí místa, kam se váže ATP.

Seznam použitých zdrojů

1. Grebe, T.W., Stock, J.B. (1999) The histidine protein kinase superfamily. *Adv. Microb. Physiol.* **41**, 139–227.
2. Nixon, B.T., Ronson, C.W., Ausubel, F.M. (1986) Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 7850–54.
3. Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M., Saito, H. (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**, 242–45.
4. Hoch, J.A. (1993) Regulation of the phosphorelay and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 441–65.
5. Cotter, P.A., Stibitz, S. (2007) c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**, 17–23.
6. MacRitchie, D.M., Buelow, D.R., Price, N.L., Raivio, T.L. (2008) Two-component signaling and gram negative envelope stress response systems. *Adv. Exp. Med. Biol.* **631**, 80–110.
7. Ohta, N., Lane, T., Ninfa, E.G., Sommer, J.M., Newton, A. (1992) A histidine protein kinase homologue required for regulation of bacterial cell division and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 10297–301.
8. Hoch, J.A. (2000) Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 165–70.
9. Wolanin, P.M., Thomason, P.A., Stock, J.B. (2002) Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol.* **3**, REVIEWS3013.
10. Forst, S., Delgado, J., Ramakrishnan, G., Inouye, M. (1988) Regulation of *ompC* and *ompF* expression in *Escherichia coli* in the absence of *envZ*. *J. Bacteriol.* **170**, 5080–85.
11. Stock, A.M., Robinson, V.L., Goudreau, P.N. (2000) Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 183–215.
12. Stock, J.B., Ninfa, A.J., Stock, A.M. (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**, 450–90.
13. West, A.H., Stock, A.M. (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 369–76.
14. Gross, R., Beier, D. (2012) *Two-component Systems in Bacteria* (Horizon Scientific Press).
15. Hoch, J.A., Silhavy, T.J. (1995) *Two-component Signal Transduction* (ASM Press).
16. Perraud, A.-L., Weiss, V., Gross, R. (1999) Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Microbiol.* **7**, 115–20.
17. Hoch, J.A., Varughese, K.I. (2001) Keeping Signals Straight in Phosphorelay Signal Transduction. *J. Bacteriol.* **183**, 4941–49.
18. Uhl, M.A., Miller, J.F. (1996) Central Role of the BvgS Receiver as a Phosphorylated Intermediate in a Complex Two-component Phosphorelay. *J. Biol. Chem.* **271**, 33176–80.

19. Stock, J. (1999) Signal transduction: Gyrate protein kinases. *Curr. Biol. CB* **9**, R364–367.
20. Tomomori, C., Tanaka, T., Dutta, R., Park, H., Saha, S.K., Zhu, Y., Ishima, R., Liu, D., Tong, K.I., Kurokawa, H., Qian, H., Inouye, M., Ikura, M. (1999) Solution structure of the homodimeric core domain of Escherichia coli histidine kinase EnvZ. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 729–34.
21. Albanesi, D., Martín, M., Trajtenberg, F., Mansilla, M.C., Haouz, A., Alzari, P.M., de Mendoza, D., Buschiazzo, A. (2009) Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 16185–90.
22. Marina, A., Waldburger, C.D., Hendrickson, W.A. (2005) Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine-kinase protein. *EMBO J.* **24**, 4247–59.
23. Parkinson, J.S., Kofoid, E.C. (1992) Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* **26**, 71–112.
24. Fassler, J.S., West, A.H. (2013) Histidine phosphotransfer proteins in fungal two-component signal transduction pathways. *Eukaryot. Cell* **12**, 1052–60.
25. Zhou, H., Lowry, D.F., Swanson, R.V., Simon, M.I., Dahlquist, F.W. (1995) NMR studies of the phosphotransfer domain of the histidine kinase CheA from Escherichia coli: assignments, secondary structure, general fold, and backbone dynamics. *Biochemistry (Mosc.)* **34**, 13858–70.
26. Kato, M., Mizuno, T., Shimizu, T., Hakoshima, T. (1997) Insights into multistep phosphorelay from the crystal structure of the C-terminal HPt domain of ArcB. *Cell* **88**, 717–23.
27. Varughese, K.I., Madhusudan, Zhou, X.Z., Whiteley, J.M., Hoch, J.A. (1998) Formation of a novel four-helix bundle and molecular recognition sites by dimerization of a response regulator phosphotransferase. *Mol. Cell* **2**, 485–93.
28. Xu, Q., West, A.H. (1999) Conservation of structure and function among histidine-containing phosphotransfer (HPt) domains as revealed by the crystal structure of YPD1. *J. Mol. Biol.* **292**, 1039–50.
29. Alex, L.A., Simon, M.I. (1994) Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *Trends Genet. TIG* **10**, 133–38.
30. Alphen, W.V., Lugtenberg, B. (1977) Influence of osmolarity of the growth medium on the outer membrane protein pattern of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **131**, 623–30.
31. Gilles-Gonzalez, M.A., Gonzalez, G. (1993) Regulation of the kinase activity of heme protein FixL from the two-component system FixL/FixJ of Rhizobium meliloti. *J. Biol. Chem.* **268**, 16293–97.
32. Lois, A.F., Ditta, G.S., Helinski, D.R. (1993) The oxygen sensor FixL of Rhizobium meliloti is a membrane protein containing four possible transmembrane segments. *J. Bacteriol.* **175**, 1103–9.
33. Weston, L.A., Kadner, R.J. (1987) Identification of uhp polypeptides and evidence for their role in exogenous induction of the sugar phosphate transport system of Escherichia coli K-12. *J. Bacteriol.* **169**, 3546–55.
34. Island, M.D., Wei, B.Y., Kadner, R.J. (1992) Structure and function of the uhp genes for the sugar phosphate transport system in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. *J. Bacteriol.* **174**, 2754–62.

35. Bourret, R.B., Hess, J.F., Borkovich, K.A., Pakula, A.A., Simon, M.I. (1989) Protein phosphorylation in chemotaxis and two-component regulatory systems of bacteria. *J. Biol. Chem.* **264**, 7085–88.
36. Iuchi, S., Matsuda, Z., Fujiwara, T., Lin, E.C. (1990) The *arcB* gene of *Escherichia coli* encodes a sensor-regulator protein for anaerobic repression of the *arc* modulon. *Mol. Microbiol.* **4**, 715–27.
37. Lukat, G.S., McCleary, W.R., Stock, A.M., Stock, J.B. (1992) Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 718–22.
38. Feng, J., Atkinson, M.R., McCleary, W., Stock, J.B., Wanner, B.L., Ninfa, A.J. (1992) Role of phosphorylated metabolic intermediates in the regulation of glutamine synthetase synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**, 6061–70.
39. Boucher, P.E., Menozzi, F.D., Loch, C. (1994) The Modular Architecture of Bacterial Response Regulators: Insights into the Activation Mechanism of the BvgA Transactivator of *Bordetella pertussis*. *J. Mol. Biol.* **241**, 363–77.
40. McCleary, W.R., Stock, J.B. (1994) Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J. Biol. Chem.* **269**, 31567–72.
41. McCleary, W.R., Stock, J.B., Ninfa, A.J. (1993) Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*? *J. Bacteriol.* **175**, 2793–98.
42. Zapf, J.W., Hoch, J.A., Whiteley, J.M. (1996) A phosphotransferase activity of the *Bacillus subtilis* sporulation protein Spo0F that employs phosphoramidate substrates. *Biochemistry (Mosc.)* **35**, 2926–33.
43. Mayover, T.L., Halkides, C.J., Stewart, R.C. (1999) Kinetic characterization of CheY phosphorylation reactions: comparison of P-CheA and small-molecule phosphodonors. *Biochemistry (Mosc.)* **38**, 2259–71.
44. Mizuno, T. (1997) Compilation of All Genes Encoding Two-component Phosphotransfer Signal Transducers in the Genome of *Escherichia coli*. *DNA Res.* **4**, 161–68.
45. Simms, S.A., Keane, M.G., Stock, J. (1985) Multiple forms of the CheB methyltransferase in bacterial chemosensing. *J. Biol. Chem.* **260**, 10161–68.
46. Lupas, A., Stock, J. (1989) Phosphorylation of an N-terminal regulatory domain activates the CheB methyltransferase in bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **264**, 17337–42.
47. Goy, M.F., Springer, M.S., Adler, J. (1977) Sensory transduction in *Escherichia coli*: Role of a protein methylation reaction in sensory adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 4964–68.
48. Stock, A.M., Mottonen, J.M., Stock, J.B., Schutt, C.E. (1989) Three-dimensional structure of CheY, the response regulator of bacterial chemotaxis. *Nature* **337**, 745–49.
49. Robinson, V.L., Buckler, D.R., Stock, A.M. (2000) A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **7**, 626–33.
50. Sanders, D.A., Gillece-Castro, B.L., Stock, A.M., Burlingame, A.L., Koshland, D.E. (1989) Identification of the site of phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, CheY. *J. Biol. Chem.* **264**, 21770–78.

51. Lukat, G.S., Stock, A.M., Stock, J.B. (1990) Divalent metal ion binding to the CheY protein and its significance to phosphotransfer in bacterial chemotaxis. *Biochemistry (Mosc.)* **29**, 5436–42.
52. Stock, A.M., Martinez-Hackert, E., Rasmussen, B.F., West, A.H., Stock, J.B., Ringe, D., Petsko, G.A. (1993) Structure of the Mg(2+)-bound form of CheY and mechanism of phosphoryl transfer in bacterial chemotaxis. *Biochemistry (Mosc.)* **32**, 13375–80.
53. Ninfa, E.G., Stock, A., Mowbray, S., Stock, J. (1991) Reconstitution of the bacterial chemotaxis signal transduction system from purified components. *J. Biol. Chem.* **266**, 9764–70.
54. Aiba, H., Nakasai, F., Mizushima, S., Mizuno, T. (1989) Phosphorylation of a Bacterial Activator Protein, OmpR, by a Protein Kinase, EnvZ, Results in Stimulation of Its DNA-Binding Ability. *J. Biochem. (Tokyo)* **106**, 5–7.
55. Forst, S., Delgado, J., Inouye, M. (1989) Phosphorylation of OmpR by the osmosensor EnvZ modulates expression of the ompF and ompC genes in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 6052–56.
56. Rampersaud, A., Harlocker, S.L., Inouye, M. (1994) The OmpR protein of Escherichia coli binds to sites in the ompF promoter region in a hierarchical manner determined by its degree of phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **269**, 12559–66.
57. Slauch, J.M., Silhavy, T.J. (1989) Genetic analysis of the switch that controls porin gene expression in Escherichia coli K-12. *J. Mol. Biol.* **210**, 281–92.
58. Martínez-Hackert, E., Stock, A.M. (1997) The DNA-binding domain of OmpR: crystal structures of a winged helix transcription factor. *Structure* **5**, 109–24.
59. Martínez-Hackert, E., Stock, A.M. (1997) Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. *J. Mol. Biol.* **269**, 301–12.
60. Iuchi, S., Lin, E.C. (1987) The narL gene product activates the nitrate reductase operon and represses the fumarate reductase and trimethylamine N-oxide reductase operons in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 3901–5.
61. Baikalov, I., Schröder, I., Kaczor-Grzeskowiak, M., Grzeskowiak, K., Gunsalus, R.P., Dickerson, R.E. (1996) Structure of the Escherichia coli response regulator NarL. *Biochemistry (Mosc.)* **35**, 11053–61.
62. Kustu, S., Santero, E., Keener, J., Popham, D., Weiss, D. (1989) Expression of sigma 54 (ntrA)-dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiol. Rev.* **53**, 367–76.
63. Osuna, J., Soberon, X., Morett, E. (1997) A proposed architecture for the central domain of the bacterial enhancer-binding proteins based on secondary structure prediction and fold recognition. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **6**, 543–55.
64. Wyman, C., Rombel, I., North, A.K., Bustamante, C., Kustu, S. (1997) Unusual oligomerization required for activity of NtrC, a bacterial enhancer-binding protein. *Science* **275**, 1658–61.
65. Fiedler, U., Weiss, V. (1995) A common switch in activation of the response regulators NtrC and PhoB: phosphorylation induces dimerization of the receiver modules. *EMBO J.* **14**, 3696–3705.

66. Weiss, V., Claverie-Martin, F., Magasanik, B. (1992) Phosphorylation of nitrogen regulator I of *Escherichia coli* induces strong cooperative binding to DNA essential for activation of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 5088–92.
67. Blat, Y., Eisenbach, M. (1994) Phosphorylation-dependent binding of the chemotaxis signal molecule CheY to its phosphatase, CheZ. *Biochemistry (Mosc.)* **33**, 902–6.
68. Posas, F., Saito, H. (1998) Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J.* **17**, 1385–94.
69. Barrett, J.F., Hoch, J.A. (1998) Two-Component Signal Transduction as a Target for Microbial Anti-Infective Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1529–36.
70. Gilles-Gonzalez, M.-A., Gonzalez, G. (2005) Heme-based sensors: defining characteristics, recent developments, and regulatory hypotheses. *J. Inorg. Biochem.* **99**, 1–22.
71. Handbook of Porphyrin Science: Biochemistry of tetrapyrroles (2010) (World Scientific).
72. Roberts, G.P., Thorsteinsson, M.V., Kerby, R.L., Lanzilotta, W.N., Poulos, T. (2001) CooA: a heme-containing regulatory protein that serves as a specific sensor of both carbon monoxide and redox state. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **67**, 35–63.
73. Chang, A.L., Tuckerman, J.R., Gonzalez, G., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M., Gilles-Gonzalez, M.A. (2001) Phosphodiesterase A1, a regulator of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, is a heme-based sensor. *Biochemistry (Mosc.)* **40**, 3420–26.
74. Tagliabue, L., Antoniani, D., Maciag, A., Bocci, P., Raffaelli, N., Landini, P. (2010) The diguanylate cyclase YddV controls production of the exopolysaccharide poly-N-acetylglucosamine (PNAG) through regulation of the PNAG biosynthetic pgaABCD operon. *Microbiol. Read. Engl.* **156**, 2901–11.
75. Gilles-Gonzalez, M.A., Ditta, G.S., Helinski, D.R. (1991) A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. *Nature* **350**, 170–72.
76. Gong, W., Hao, B., Mansy, S.S., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M.A., Chan, M.K. (1998) Structure of a biological oxygen sensor: A new mechanism for heme-driven signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 15177–82.
77. Martínková, M., Kitanishi, K., Shimizu, T. (2013) Heme-based globin-coupled oxygen sensors: linking oxygen binding to functional regulation of diguanylate cyclase, histidine kinase, and methyl-accepting chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **288**, 27702–11.
78. Taylor, B.L., Zhulin, I.B. (1999) PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 479–506.
79. Zhulin, I.B., Taylor, B.L., Dixon, R. (1997) PAS domain S-boxes in archaea, bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 331–33.
80. Borgstahl, G.E., Williams, D.R., Getzoff, E.D. (1995) 1.4 Å structure of photoactive yellow protein, a cytosolic photoreceptor: unusual fold, active site, and chromophore. *Biochemistry (Mosc.)* **34**, 6278–87.
81. Huala, E., Oeller, P.W., Liscum, E., Han, I.S., Larsen, E., Briggs, W.R. (1997) Arabidopsis NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* **278**, 2120–23.

82. Hao, B., Isaza, C., Arndt, J., Soltis, M., Chan, M.K. (2002) Structure-based mechanism of O₂ sensing and ligand discrimination by the FixL heme domain of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochemistry (Mosc.)* **41**, 12952–58.
83. Vreede, J., Horst, M.A. van der, Hellingwerf, K.J., Crielaard, W., Aalten, D.M.F. van (2003) PAS Domains Common structure and common flexibility. *J. Biol. Chem.* **278**, 18434–39.
84. Möglich, A., Ayers, R.A., Moffat, K. (2009) Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Struct. Lond. Engl. 1993* **17**, 1282–94.
85. Sevvana, M., Vijayan, V., Zweckstetter, M., Reinelt, S., Madden, D.R., Herbst-Irmer, R., Sheldrick, G.M., Bott, M., Griesinger, C., Becker, S. (2008) A ligand-induced switch in the periplasmic domain of sensor histidine kinase CitA. *J. Mol. Biol.* **377**, 512–23.
86. Halavaty, A.S., Moffat, K. (2007) N- and C-terminal flanking regions modulate light-induced signal transduction in the LOV2 domain of the blue light sensor phototropin 1 from *Avena sativa*. *Biochemistry (Mosc.)* **46**, 14001–9.
87. Möglich, A., Moffat, K. (2007) Structural basis for light-dependent signaling in the dimeric LOV domain of the photosensor YtvA. *J. Mol. Biol.* **373**, 112–26.
88. Key, J., Hefti, M., Purcell, E.B., Moffat, K. (2007) Structure of the redox sensor domain of *Azotobacter vinelandii* NifL at atomic resolution: signaling, dimerization, and mechanism. *Biochemistry (Mosc.)* **46**, 3614–23.
89. Cheung, J., Bingman, C.A., Reyngold, M., Hendrickson, W.A., Waldburger, C.D. (2008) Crystal structure of a functional dimer of the PhoQ sensor domain. *J. Biol. Chem.* **283**, 13762–70.
90. Stacey, G., Burris, R.H., Evans, H.J. (1992) *Biological Nitrogen Fixation* (Springer).
91. Monson, E.K., Ditta, G.S., Helinski, D.R. (1995) The Oxygen Sensor Protein, FixL, of *Rhizobium meliloti* ROLE OF HISTIDINE RESIDUES IN HEME BINDING, PHOSPHORYLATION, AND SIGNAL TRANSDUCTION. *J. Biol. Chem.* **270**, 5243–50.
92. Anantharaman, V., Koonin, E.V., Aravind, L. (2001) Regulatory potential, phyletic distribution and evolution of ancient, intracellular small-molecule-binding domains. *J. Mol. Biol.* **307**, 1271–92.
93. Heikaus, C.C., Pandit, J., Klevit, R.E. (2009) Cyclic Nucleotide Binding GAF Domains from Phosphodiesterases - Structural and Mechanistic Insights. *Struct. Lond. Engl. 1993* **17**, 1551–57.
94. Zoraghi, R., Corbin, J.D., Francis, S.H. (2004) Properties and Functions of GAF Domains in Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases and Other Proteins. *Mol. Pharmacol.* **65**, 267–78.
95. Ho, Y.-S.J., Burden, L.M., Hurley, J.H. (2000) Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *EMBO J.* **19**, 5288–99.
96. Wayne, L.G., Sohaskey, C.D. (2001) Nonreplicating persistence of mycobacterium tuberculosis. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 139–63.
97. Roberts, D.M., Liao, R.P., Wisedchaisri, G., Hol, W.G.J., Sherman, D.R. (2004) Two Sensor Kinases Contribute to the Hypoxic Response of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **279**, 23082–87.

98. Sherman, D.R., Voskuil, M., Schnappinger, D., Liao, R., Harrell, M.I., Schoolnik, G.K. (2001) Regulation of the Mycobacterium tuberculosis hypoxic response gene encoding α -crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 7534–39.
99. Sousa, E.H.S., Tuckerman, J.R., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M.-A. (2007) DosT and DevS are oxygen-switched kinases in Mycobacterium tuberculosis. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **16**, 1708–19.
100. Voet, D., Voet, J.G. (2011) *Biochemistry* (John Wiley & Sons).
101. Hou, S., Larsen, R.W., Boudko, D., Riley, C.W., Karatan, E., Zimmer, M., Ordal, G.W., Alam, M. (2000) Myoglobin-like aerotaxis transducers in Archaea and Bacteria. *Nature* **403**, 540–44.
102. Vinogradov, S.N., Tinajero-Trejo, M., Poole, R.K., Hoogewijs, D. (2013) Bacterial and archaeal globins — A revised perspective. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1834**, 1789–1800.
103. Vinogradov, S.N., Moens, L. (2008) Diversity of Globin Function: Enzymatic, Transport, Storage, and Sensing. *J. Biol. Chem.* **283**, 8773–77.
104. Zhang, W., Phillips Jr., G.N. (2003) Structure of the Oxygen Sensor in Bacillus subtilis: Signal Transduction of Chemotaxis by Control of Symmetry. *Structure* **11**, 1097–1110.
105. Hou, S., Freitas, T., Larsen, R.W., Piatibratov, M., Sivozhelezov, V., Yamamoto, A., Meleshkevitch, E.A., Zimmer, M., Ordal, G.W., Alam, M. (2001) Globin-coupled sensors: A class of heme-containing sensors in Archaea and Bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9353–58.
106. Zhang, W., Olson, J.S., Phillips, G.N. (2005) Biophysical and Kinetic Characterization of HemAT, an Aerotaxis Receptor from Bacillus subtilis. *Biophys. J.* **88**, 2801–14.
107. El-Mashtoly, S.F., Gu, Y., Yoshimura, H., Yoshioka, S., Aono, S., Kitagawa, T. (2008) Protein Conformation Changes of HemAT-Bs upon Ligand Binding Probed by Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **283**, 6942–49.
108. Yoshimura, H., Yoshioka, S., Kobayashi, K., Ohta, T., Uchida, T., Kubo, M., Kitagawa, T., Aono, S. (2006) Specific hydrogen-bonding networks responsible for selective O₂ sensing of the oxygen sensor protein HemAT from Bacillus subtilis. *Biochemistry (Mosc.)* **45**, 8301–7.
109. El-Mashtoly, S.F., Kubo, M., Gu, Y., Sawai, H., Nakashima, S., Ogura, T., Aono, S., Kitagawa, T. (2012) Site-specific Protein Dynamics in Communication Pathway from Sensor to Signaling Domain of Oxygen Sensor Protein, HemAT-Bs TIME-RESOLVED ULTRAVIOLET RESONANCE RAMAN STUDY. *J. Biol. Chem.* **287**, 19973–84.
110. Kitanishi, K., Kobayashi, K., Uchida, T., Ishimori, K., Igarashi, J., Shimizu, T. (2011) Identification and functional and spectral characterization of a globin-coupled histidine kinase from Anaeromyxobacter sp. Fw109-5. *J. Biol. Chem.* **286**, 35522–34.
111. Shi, X., Wegener-Feldbrugge, S., Huntley, S., Hamann, N., Hedderich, R., Søgaard-Andersen, L. (2008) Bioinformatics and Experimental Analysis of Proteins of Two-Component Systems in Myxococcus xanthus. *J. Bacteriol.* **190**, 613–24.
112. Johnson, L.N., O'Reilly, M. (1996) Control by phosphorylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 762–69.

113. Miksanova, M., Igarashi, J., Minami, M., Sagami, I., Yamauchi, S., Kurokawa, H., Shimizu, T. (2006) Characterization of heme-regulated eIF2 α kinase: roles of the N-terminal domain in the oligomeric state, heme binding, catalysis, and inhibition. *Biochemistry (Mosc.)* **45**, 9894–9905.
114. Kinoshita-Kikuta, E., Kinoshita, E., Yamada, A., Endo, M., Koike, T. (2006) Enrichment of phosphorylated proteins from cell lysate using a novel phosphate-affinity chromatography at physiological pH. *PROTEOMICS* **6**, 5088–95.
115. Takeda, H., Kawasaki, A., Takahashi, M., Yamada, A., Koike, T. (2003) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of phosphorylated compounds using a novel phosphate capture molecule. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 2075–81.
116. Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Takiyama, K., Koike, T. (2006) Phosphate-binding Tag, a New Tool to Visualize Phosphorylated Proteins. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 749–57.
117. Barbieri, C.M., Stock, A.M. (2008) Universally applicable methods for monitoring response regulator aspartate phosphorylation both in vitro and in vivo using Phos-tag-based reagents. *Anal. Biochem.* **376**, 73–82.
118. Yamada, S., Nakamura, H., Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T., Shiro, Y. (2007) Separation of a phosphorylated histidine protein using phosphate affinity polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **360**, 160–62.
119. Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T. (2007) [Specific recognition and detection of phosphorylated proteins using characteristics of metal ion]. *Yakugaku Zasshi* **127**, 1897–1913.
120. <http://www.addgene.org/vector-database/2551/>, stav ze dne 25.3.2014
121. Studier, F.W., Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113–30.
122. http://www.emdmillipore.com/life-science-research/vector-table-novagen-pet-vector-table/c_HdSb.s1O77QAAAEhPqsLdcab., stav ze dne 27.3.2014
123. <http://www.addgene.org/vector-database/2888/>, stav ze dne 27.3.2014
124. De Boer, H.A., Comstock, L.J., Vasser, M. (1983) The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 21–25.
125. Grodberg, J., Dunn, J.J. (1988) ompT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* **170**, 1245–53.
126. http://www.med.unc.edu/pharm/sondeklab/Lab%20Resources/protein_purification_handbooks/GST-gene%20fusion%20system.pdf., stav ze dne 28.3.2014
127. Berry, E.A., Trumpower, B.L. (1987) Simultaneous determination of hemes a, b, and c from pyridine hemochrome spectra. *Anal. Biochem.* **161**, 1–15.
128. Switzer III, R.C., Merrill, C.R., Shifrin, S. (1979) A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **98**, 231–37.
129. Bagshaw, C.R. (2001) ATP analogues at a glance. *J. Cell Sci.* **114**, 459–60.
130. <http://web.expasy.org/protparam/>, stav ze dne 3.11.2013
131. Sheridan, R.C., Mccullough, J.F., Wakefield, Z.T., Allcock, H.R., Walsh, E.J. (1972) *Inorganic Syntheses*, Cotton, F.A. (John Wiley & Sons, Inc.), s. 23–26.

132. Lineweaver, H., Burk, D. (1934) The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658–66.
133. Fojtíková V. (2012) *Důležité role hemu: signál pro hem-detekující proteiny a detekční místo v plyn-detekujících proteinech: Bakalářská práce* (PřF UK Praha).
134. Johnson, K.A., Goody, R.S. (2011) The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *Biochemistry (Mosc.)* **50**, 8264–69.
135. Kitanishi, K., Kobayashi, K., Kawamura, Y., Ishigami, I., Ogura, T., Nakajima, K., Igarashi, J., Tanaka, A., Shimizu, T. (2010) Important Roles of Tyr43 at the Putative Heme Distal Side in the Oxygen Recognition and Stability of the Fe(II)–O₂ Complex of YddV, a Globin-Coupled Heme-Based Oxygen Sensor Diguanylate Cyclase. *Biochemistry (Mosc.)* **49**, 10381–93.
136. Koshland, D.E. (1952) Effect of Catalysts on the Hydrolysis of Acetyl Phosphate. Nucleophilic Displacement Mechanisms in Enzymatic Reactions ¹. *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 2286–92.
137. Lodish, H. (2004) *Molecular Cell Biology* (W. H. Freeman).
138. Jungbauer, A., Kaar, W. (2007) Current status of technical protein refolding. *J. Biotechnol.* **128**, 587–96.
139. http://genome.jgi-psf.org/ana_f/ana_f.home.html, stav ze dne 2.4.2014
140. Bilwes, A.M., Quezada, C.M., Croal, L.R., Crane, B.R., Simon, M.I. (2001) Nucleotide binding by the histidine kinase CheA. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 353–60.
141. Casino, P., Rubio, V., Marina, A. (2009) Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell* **139**, 325–36.
142. Casino, P., Miguel-Romero, L., Marina, A. (2014) Visualizing autophosphorylation in histidine kinases. *Nat. Commun.* **5**, 3258.
143. Kojetin, D.J., Thompson, R.J., Benson, L.M., Naylor, S., Waterman, J., Davies, K.G., Opperman, C.H., Stephenson, K., Hoch, J.A., Cavanagh, J. (2005) Structural analysis of divalent metals binding to the *Bacillus subtilis* response regulator Spo0F: the possibility for in vitro metalloregulation in the initiation of sporulation. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* **18**, 449–66.
144. Madhusudan, Zapf, J., Whiteley, J.M., Hoch, J.A., Xuong, N.H., Varughese, K.I. (1996) Crystal structure of a phosphatase-resistant mutant of sporulation response regulator Spo0F from *Bacillus subtilis*. *Structure* **4**, 679–90.
145. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a2647?lang=en®ion=CZ>, stav ze dne 25.4.2014
146. Silversmith, R.E., Appleby, J.L., Bourret, R.B. (1997) Catalytic mechanism of phosphorylation and dephosphorylation of CheY: kinetic characterization of imidazole phosphates as phosphodonors and the role of acid catalysis. *Biochemistry (Mosc.)* **36**, 14965–74.
147. McCleary, W.R., Stock, J.B. (1994) Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J. Biol. Chem.* **269**, 31567–72.