

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie



Bc. Eva Tajovská

**Strukturní charakterizace modelového zástupce hemových
kyslíkových senzorů**

Structural characterisation of a model heme-containing oxygen sensor

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitelka: Doc. RNDr. Markéta Martínková, Ph.D.

Praha 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 18. srpna 2022

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala své školitelce doc. RNDr. Markétě Martínkové, Ph.D. za její odborné rady, čas, ochotu a vstřícnost při zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Petru Pompachovi, Ph.D. a Mgr. Pavle Vaňkové, Ph.D. (BIOCEV) za hmotnostně-spektrometrická měření. Děkuji také doc. RNDr. Václavovi Martínkovi, Ph.D. za proškolení v gelové permeační chromatografii. Velký dík patří také paní Anně Ammerové a kolegům z laboratoře 217 za hodnotné rady. Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu, kterou mi během celého studia věnovali.

Abstrakt

Jednou z podskupin hemoproteinů jsou hemové senzory plynů, které jsou schopny detekovat dvouatomové plynné molekuly ve svém bezprostředním okolí. Po navázání molekuly plynu na atom železa hemu v sensorové doméně těchto proteinů nebo naopak po její disociaci z tohoto atomu dochází k přenosu signálu ze sensorové domény do domény funkční a následně k regulaci důležitých buněčných funkcí. Pochopení mechanismu působení těchto sensorů je klíčové pro případné ovlivnění jejich funkce. Taková znalost by pak následně umožnila využití sensorů plynů jako terapeutických cílů pro vývoj antibiotik nové generace, pokud vezmeme v úvahu jejich přítomnost v patologických bakteriích.

Předkládaná diplomová práce se zabývá modelovým zástupcem sensorových hemoproteinů detekujících plyny, kyslíkovým senzorem *EcDOS* z *E. coli*, a jeho apoformou, *EcDOS His77Ala*. Oba proteiny byly připraveny rekombinantní expresí a purifikací a následně spektrofotometricky charakterizovány. Pomocí gelové permeační chromatografie byl stanoven oligomerní stav *EcDOS* Fe(III), *EcDOS* Fe(II)-O₂ a *EcDOS His77Ala* za různých podmínek (různé způsoby temperování preparátu, přítomnost substrátu c-di-GMP atd.). Dále byla studována strukturní dynamika *EcDOS* Fe(III), *EcDOS* Fe(II)-O₂ a *EcDOS His77Ala* pomocí metody HDX-MS.

Klíčová slova: hem, hemové sensorové proteiny, kyslíkový senzor, přenos signálu, oligomerní stavy proteinů, vodíko-deuteriová výměna, hmotnostní spektrometrie

Abstract

One subgroup of hemoproteins are heme-based gas sensors, which are able to detect diatomic gas molecules in their immediate surroundings. Upon binding of a gas molecule to the heme iron in a sensor domain of these proteins or, conversely, upon its dissociation from the heme iron, the signal is then transmitted from the sensor domain to a functional domain and subsequent regulation of important cellular functions occurs. Understanding the regulatory mechanism of gas sensors is key to potentially manipulating their function. Such knowledge would then allow the use of heme-based gas sensors as therapeutic targets for the development of next-generation antibiotics, if we take into account their presence in pathological bacteria.

The diploma thesis focuses on a model heme-based gas sensor, the oxygen sensor *EcDOS* from *E. coli*, and its apoform, *EcDOS His77Ala*. Both proteins were prepared by recombinant expression and purification, and subsequently spectrophotometrically characterized. Using gel permeation chromatography, the oligomeric states of *EcDOS* Fe(III), *EcDOS* Fe(II)-O₂ and *EcDOS His77Ala* were determined under different conditions (different temperatures of protein incubation, presence of c-di-GMP substrate etc.). Furthermore, the structural dynamics of *EcDOS* Fe(III), *EcDOS* Fe(II)-O₂ and *EcDOS His77Ala* were studied using the HDX-MS method.

Key words: heme, heme sensor proteins, oxygen sensors, signal transduction, protein oligomeric states, hydrogen-deuterium exchange, mass spectrometry

[IN CZECH]

Obsah

Seznam použitých zkratk a symbolů	9
1 Literární přehled.....	13
1.1 Hemoproteiny	13
1.2 Sensorové hemoproteiny	15
1.3 Sensorové hemoproteiny detekující hem	16
1.3.1 Transkripční faktor Hap1	18
1.4 Sensorové hemoproteiny detekující plyny	19
1.4.1 Sensorové hemoproteiny detekující oxid uhelnatý	20
1.4.2 Sensorové hemoproteiny detekující oxid dusnatý	20
1.4.3 Sensorové hemoproteiny detekující kyslík	21
1.4.3.1 Sensory kyslíku obsahující globinovou doménu	21
1.4.3.2 Sensory kyslíku obsahující GAF doménu	23
1.4.3.3 Sensory kyslíku obsahující PAS doménu	24
1.5 Fosfodiesterasa <i>EcDOS</i>	25
2 Cíle diplomové práce	31
3 Přístroje, materiál a použité metody.....	32
3.1 Použité přístroje.....	32
3.2 Použitý materiál a chemikálie.....	33
3.3 Použité metody	34
3.3.1 Příprava agarových ploten.....	34
3.3.2 Transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i> BL-21 (DE3)	35
3.3.3 Exprese proteinu <i>EcDOS</i> , respektive <i>EcDOS His77Ala</i> v buňkách <i>E. coli</i> BL-21 (DE3)	35
3.3.4 Izolace proteinu <i>EcDOS</i> , respektive <i>EcDOS His77Ala</i> z buněk <i>E. coli</i> BL-21 (DE3).....	37
3.3.5 Stanovení koncentrace plazmidové DNA	39

3.3.6 Stanovení koncentrace proteinu pomocí spektrofotometru DS-11 (DeNovix)	39
3.3.7 Stanovení koncentrace proteinu pomocí metody používající bicinchoninovou kyselinu (BCA)	40
3.3.8 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného	40
3.3.9 Příprava proteinu <i>EcDOS</i> ve formě Fe(II)-O ₂	42
3.3.10 Spektrofotometrická analýza proteinů <i>EcDOS</i> a <i>EcDOS His77Ala</i>	43
3.3.11 Analytická gelová permeační chromatografie	44
3.3.11.1 Kalibrace kolony Superdex 200 10/300 GL	44
3.3.11.2 Příprava vzorků proteinů <i>EcDOS His77Ala</i> , <i>EcDOS Fe(III)</i> a <i>EcDOS Fe(II)-O₂</i> pro analýzu pomocí gelové permeační chromatografie	45
3.3.12 Vodíko-deuteriová výměna ve spojení s hmotnostní spektrometrií	46
4 Výsledky	49
4.1 Exprese proteinů <i>EcDOS</i> a <i>EcDOS His77Ala</i>	49
4.2 Izolace proteinů <i>EcDOS</i> a <i>EcDOS His77Ala</i>	49
4.3 Spektrální analýza <i>EcDOS Fe(III)</i> a <i>EcDOS Fe(II)-O₂</i>	52
4.4 Spektrofotometrická analýza proteinu <i>EcDOS His77Ala</i>	53
4.5 Studium oligomerních stavů proteinů <i>EcDOS Fe(III)</i> , <i>EcDOS His77Ala</i> a <i>EcDOS Fe(II)-O₂</i> pomocí gelové permeační chromatografie	53
4.5.1 Analýza oligomerních stavů proteinu <i>EcDOS Fe(III)</i>	54
4.5.2 Analýza oligomerních stavů proteinu <i>EcDOS Fe(II)-O₂</i>	57
4.5.3 Analýza oligomerních stavů proteinu <i>EcDOS His77Ala</i>	58
4.5.4 Vliv substrátu c-di-GMP na oligomerní stavy proteinů <i>EcDOS Fe(III)</i> , <i>EcDOS Fe(II)-O₂</i> a <i>EcDOS His77Ala</i>	60
4.6 Analýza strukturní dynamiky proteinů <i>EcDOS Fe(III)</i> , <i>EcDOS Fe(II)-O₂</i> a <i>EcDOS His77Ala</i>	63
4.6.1 Peptidové mapování	63
4.6.2 Deuterační profil proteinu <i>EcDOS Fe(III)</i>	66

4.6.3 Deuterační profil proteinu <i>EcDOS Fe(II)-O₂</i>	68
4.6.4 Deuterační profil proteinu <i>EcDOS His77Ala</i>	70
4.6.5 Porovnání deuteračních profilů <i>EcDOS Fe(III)</i> a <i>EcDOS Fe(II)-O₂</i>	72
4.6.6 Porovnání deuteračních profilů <i>EcDOS Fe(III)</i> a <i>EcDOS His77Ala</i>	74
4.6.7 Porovnání deuteračních profilů <i>EcDOS His77Ala</i> a <i>EcDOS Fe(II)-O₂</i>	76
5 Diskuse	79
6 Závěr.....	93
Seznam použitých zdrojů	95

Seznam použitých zkratek a symbolů

A_{260}	absorbance při 260 nm
A_{280}	absorbance při 280 nm
<i>AfGcHK</i>	kyslíkový senzor s globinovou strukturou sensorové domény a histidinkinasovou aktivitou, který pochází z bakterie <i>Anaeromyxobacter</i> sp. (kmen Fw 109-5)
AMP	adenosin-5'-monofosfát
Bach1	z anglického „broad complex, tramtrack, bric-a-brac and cap'n'collar homologue 1“; senzor hemu, transkripční faktor
BCA	kyselina bicinchoninová
BIS	N,N'-methylen-bis-akrylamid
<i>BpeGReg</i>	kyslíkový senzor s globinovou strukturou sensorové domény a diguanylátcyklasovou aktivitou, který pochází z bakterie <i>Bordetella pertusis</i>
cAMP	cyklický adenosin-3',5'-monofosfát
c-di-GMP	cyklický bis-(3',5')-guanosinmonofosfát
C_{DNA}	koncentrace plazmidové DNA v roztoku [$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]
CF	přepočítávací faktor [$\text{ng}\cdot\text{cm}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]
cGMP	cyklický guanosin-3',5'-monofosfát
CP motiv	strukturní motiv senzorů hemu, složený z cysteinu následovaného prolinem v aminokyselinové sekvenci
C_{prot}	hmotnostní koncentrace proteinu v roztoku [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$]
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DosR	transkripční faktor z mikroorganismu <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , který v této bakterii spolu s proteinem DosS nebo DosT reguluje genovou expresi

DosS	kyslíkový senzor s GAF senzorovou doménou z mikroorganismu <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DosT	histidinkinasa z <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , detekující kyslík a obsahující GAF doménu
EAL	doména pojmenovaná podle konzervovaného strukturního aminokyselinového motivu, vykazující fosfodiesterasovou aktivitu
EcDOS	z anglického „ <i>Escherichia coli</i> direct oxygen sensor“; přímý kyslíkový senzor bakterie <i>Escherichia coli</i> , který vykazuje fosfodiesterasovou aktivitu
EcDOS Fe(II)-O ₂	EcDOS s iontem železa hemu ve stavu Fe(II)-O ₂
EcDOS Fe(II)	EcDOS s atomem železa hemu ve stavu Fe(II)
EcDOS Fe(III)	EcDOS s atomem železa hemu ve stavu Fe(III)
EcDOS His77Ala	apoforna EcDOS, mutantní protein neobsahující His77 a postrádající schopnost vázat hem
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
GAF	strukturní motiv senzorové domény hemových kyslíkových senzorů, zkratka vytvořená z anglických označení proteinů, ve kterých byl tento motiv poprvé rozpoznán: „cGMP-specific phosphodiesterases“, „ <i>Anabaena</i> adenyl cyclases“ a „ <i>Escherichia coli</i> formate hydrogenlyase transcriptional activator“
GCS	z anglického „globin-coupled oxygen sensor“; hemový senzor kyslíku s globinovou strukturou senzorové domény
GGDEF	doména vykazující diguanylátcyklasovou aktivitu
GTP	guanosin-5'-trifosfát
Hap1	z anglického „heme activator protein“; transkripční faktor, který je regulovaný hemem
HDX	z anglického „hydrogen-deuterium exchange“; vodíko-deuteriová výměna

HDX-MS	z anglického „hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry“; vodíko-deuteriová výměna ve spojení s hmotnostní spektrometrií
H-NOX	z anglického „heme-nitric oxide binding domain“; strukturní motiv sensorové domény hemových sensorů oxidu dusnatého
HPLC	z anglického „high-performance liquid chromatography“; vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Hsp90	z anglického „90 kDa heat shock protein“; 90kDa protein teplotního šoku
IPTG	isopropyl β -1-D-thiogalaktopyranosid
<i>l</i>	optická dráha paprsku světla [cm]
LB	Luria-Bertani
LC-MS	z anglického „liquid chromatography-mass spectrometry“; kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
l-di-GMP	linearizovaná forma cyklického bis-(3',5')-guanosinmonofosfátu
<i>M</i>	molekulová hmotnost [Da]
MS	z anglického „mass spectrometry“; hmotnostní spektrometrie
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
PAS	strukturní motiv hemových sensorů kyslíku, zkratka vytvořená z anglických označení proteinů, ve kterých byl tento motiv poprvé identifikován: „ <i>Drosophila</i> period clock protein“, „vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ a „ <i>Drosophila</i> single minded protein“
PAS-A	doména vázající hem, která se nachází v proteinu <i>EcDOS</i>
PAS-B	doména vyskytující se v proteinu <i>EcDOS</i> , následující po PAS-A doméně
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
RPM	z anglického „revolutions per minute“; otáčky za minutu

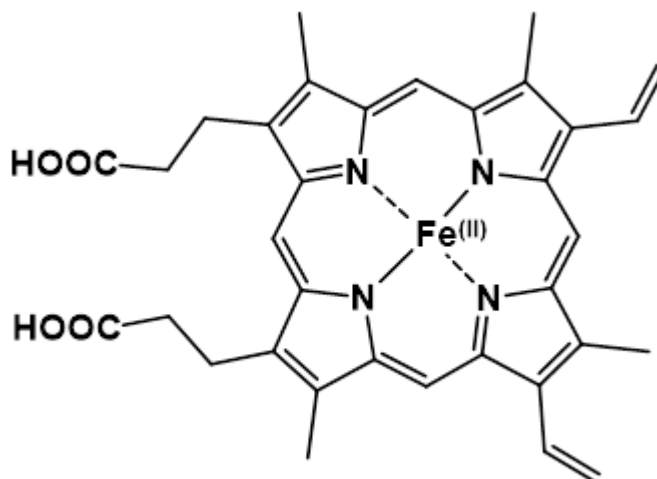
RR	z anglického „response regulator“; protein regulující odpověď
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného
sGC	z anglického „soluble guanylate cyclase“; solubilní guanylátcyklasa, která detekuje oxid dusnatý
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminoethan
UV-VIS	ultrafialovo-viditelná oblast elektromagnetického záření
v/v	objemová procenta
w/v	hmotnostně-objemová procenta
YddV	kyslíkový senzor z <i>Escherichia coli</i> s diguanylátcyklasovou aktivitou a globinovou senzorovou doménou
ϵ_{280}	molární absorpční koeficient při 280 nm [$l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$]

1 Literární přehled

1.1 Hemoproteiny

Hemoproteiny se řadí mezi metaloproteiny, které jsou bohatě zastoupeny v živých soustavách [1]. Nedílnou součástí metaloproteinů je ion kovu, kterým může být například ion hořčíku nebo železa. Ten pak pomáhá metaloproteinům nejen uspořádat se do požadované konformace, ale také plnit důležité fyziologické funkce (například transport molekul nebo elektronů) [2,3].

Do skupiny hemoproteinů náleží proteiny, kterým jako prostetická skupina slouží hem [4]. Základem molekuly hemu je planární porfinový skelet. Porfin je složen ze čtyř pyrrolových kruhů propojených v α -polohách methinovými můstky. Substitucí porfinu v β -polohách pyrrolových jader vzniká jeho derivát – porfyrin. Existuje více izomerů porfyrinů, které se mezi sebou liší charakterem a uspořádáním substituentů. Izomer protoporfyrin IX, který je přítomen v hemoproteinech, obsahuje dva propionátové, dva vinylové a čtyři methylové substituenty. Jako hem *b* se označuje struktura protoporfyrinu IX, v jejímž centru je umístěn atom železa asociovaný se čtyřmi atomy dusíku pyrrolových jader (vizte obr. 1.1) [5,6].



Obrázek 1.1: Struktura hemu *b*. Vytvořeno v programu ChemSketch [7].

Hem *b* je nejrozšířenějším typem hemu, který se nachází v proteinech [8]. Vytvoření kovalentních vazeb mezi vinylovými postranními řetězci hemu *b* a postranními skupinami dvou cysteinů proteinu vede ke vzniku hemu *c*, který lze nalézt například v cytochromech *c* [8,9]. Dalším derivátem hemu *b*, jenž se nachází například v cytochromech *a*, je hem *a* [10].

Ačkoliv se hem v buňce podílí na plnění celé škály významných úloh, volný hem je při koncentracích přesahujících $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ cytotoxický a vykazuje vysokou hydrofobicitu. Jeho toxické působení tkví především v tvorbě reaktivních forem kyslíku, které se vytvářejí reakcí peroxidu vodíku s ionty železa hemu (tzv. Fentonova reakce) [11,12]. Právě proto je klíčové zachovávat koncentraci volného hemu uvnitř buněk na nízké úrovni. To je zajištěno regulací jeho biosyntézy, degradace a transportu [11,13]. Během katabolismu hemu se uvolňují oxid uhelnatý, bilirubin a ion železa [14], který je vychytáván proteiny zajišťujícími jeho transport nebo skladování (transferin či feritin) [15]. Volný hem může být, podobně jako volný ion železa, detoxikován vytvořením komplexu s proteiny (například albumin nebo hemopexin) [16].

Jak již bylo zmíněno výše, ion železa umístěný ve středu hemu vytváří čtyři koordinačně kovalentní vazby s dusíkovými atomy pyrrolových kruhů (ekvatoriální ligandy). Další dvě koordinačně kovalentní vazby vycházející z atomu železa mohou být využity k asociaci s jedním nebo dvěma axiálními ligandy [17]. Příkladem těchto ligandů jsou molekuly plynů (kyslík, oxid dusnatý a oxid uhelnatý) [18]. Axiální interakcí jsou ke středovému atomu železa připojeny také atom dusíku nebo atom síry, které jsou součástí postranních řetězců aminokyselin v hemoproteinech (například histidin, cystein či methionin) [19].

Hemoproteiny se v živých organismech účastní mnoha biologicky významných procesů a vyznačují se vysokou funkční rozmanitostí [20]. Právě proto jsou v literatuře běžně rozdělovány do čtyř hlavních skupin na základě funkce, kterou vykonávají.

Do první skupiny patří hemoproteiny zprostředkávající přenos a uskladnění molekul plynů (především kyslíku). Zástupci této skupiny jsou myoglobin a hemoglobin [21]. V jejich případě je jedním z axiálních ligandů iontu železa hemu histidin a druhým je molekula kyslíku [17]. Efektivita přenosu kyslíku a afinita těchto hemoproteinů k němu má vliv na mnoho fyziologických dějů [21].

Do druhé skupiny lze zařadit hemoproteiny mající enzymovou aktivitu, které katalyzují většinou oxidačně-redukční reakce. Například cytochromy P450 oxidují xenobiotika pomocí molekulárního kyslíku, čímž se významně podílejí na první fázi jejich biotransformace [20,22]. Dalšími zástupci této skupiny jsou peroxidasa a katalasa. Peroxidasa oxiduje různé reaktanty peroxidem vodíku. Katalasa disproportionuje peroxid vodíku, a tím ochraňuje organismy před oxidačním stresem (například před výše zmíněnou Fentonovou reakcí) [23].

Třetí skupinu hemoproteinů představují cytochromy, které přenášejí elektrony například v dýchacím řetězci [24]. Princip biologické aktivity cytochromů spočívá v reverzibilní změně oxidačně-redukčního stavu atomu železa hemu, čímž je umožněn přenos elektronů ve směru vzrůstajícího redoxního potenciálu.

Poslední skupinou jsou sensorové hemoproteiny, které se účastní signalizace [25]. V jejich případě poskytuje hem vazebné místo pro signální molekuly (molekuly plynů) nebo sám slouží jako primární signál. Tím je vyvolána specifická buněčná odezva. Na základě typu signálu, který sensorové hemoproteiny detekují, jsou členěny do dalších dvou podskupin – na hemové sensorové proteiny, které detekují plyny (hemové senzory plynů), a na hemové sensorové proteiny, které detekují hem (senzory hemu). Podrobněji o hemových sensorových proteinech pojednává následující kapitola (1.2).

1.2 Sensorové hemoproteiny

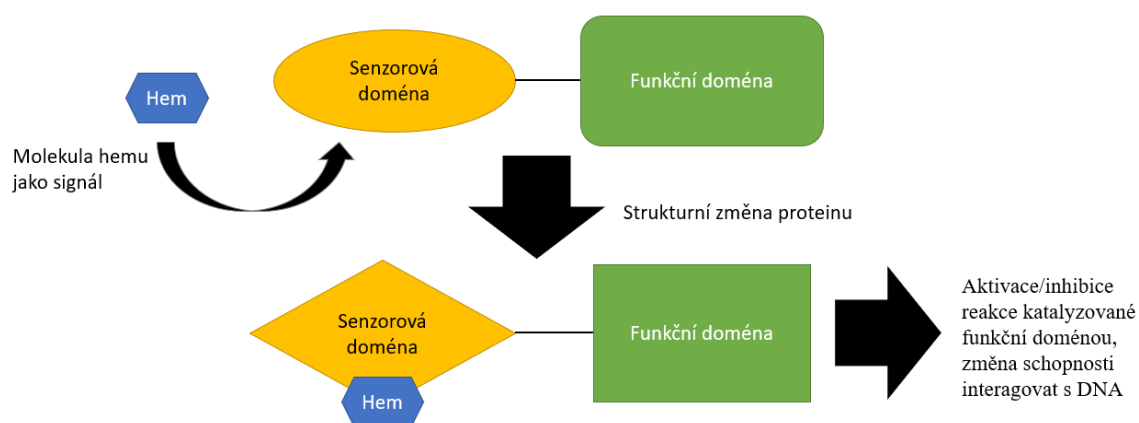
Skupina hemových sensorových proteinů zahrnuje velký počet různorodých zástupců, které se vyskytují v prokaryotických i v eukaryotických organismech. Tato skupina proteinů plní nenahraditelnou úlohu v mnoha fyziologických dějích tím, že reagují na změnu intracelulárních nebo extracelulárních podmínek a následně zprostředkovávají adaptační mechanismy, které odpovídají na tyto změny [25,26]. Mezi zásadní procesy, na jejichž regulaci se tyto proteiny podílí, patří bakteriální virulence, vasodilatace, mezibuněčná komunikace či tvorba biofilmu [25–27]. Prokaryotické organismy využívají biofilm jako primární obranu proti stresu prostředí, imunitní odpovědi hostitele a antibakteriální léčbě [28]. Sensorové hemoproteiny tak mohou být perspektivním farmaceutickým cílem pro vývoj nových antibiotik [26]. Proto je klíčové zaměřit se na detailní objasnění přenosu signálu, který je zprostředkován těmito hemoproteiny a jehož mechanismus není v řadě případů dostatečně vysvětlen [25].

Zástupci z obou podskupin hemových sensorových proteinů jsou složeny minimálně ze dvou domén – z domény sensorové a domény funkční. V sensorové doméně je umístěno vazebné místo pro hem, nebo je hem v této doméně již vázán a slouží jako interakční místo pro molekuly plynů. Funkční doména zprostředkovává následnou biologickou odpověď [25,26]. Prvotní signál, který je zaznamenán buď přímo samotným hemem, nebo molekulou plynu prostřednictvím hemu indukuje změnu struktury sensorové domény. Tento signál je posléze přenesen i do funkční domény, která zajišťuje signální odezvu, tedy interakci s deoxyribonukleovou kyselinou (DNA), expresi genů nebo enzymovou aktivitu [20,29].

1.3 Senzorové hemoproteiny detekující hem

Hem funguje pro senzory hemu jako signální molekula [25,30]. Tyto proteiny pak přizpůsobují svoji činnost v závislosti na dostupnosti volného hemu v jejich okolí. Asociace molekuly hemu na tyto hemoproteiny nebo naopak jeho disociace zajišťují regulaci mnoha fyziologických procesů (například degradace a fosforylace proteinů, transkripce či translace).

Mechanismus signalizace, která je zprostředkována senzory hemu, je znázorněn na obrázku 1.2 [20,25]. Transdukce signálu je zahájena vazbou molekuly hemu do sensorové domény (prvotní signál), přičemž tato reverzibilní interakce vyvolá změnu její struktury (druhotný signál). V důsledku toho dochází ke konformační změně funkční domény a následně k ovlivnění její činnosti. Většina funkčních domén sensorů hemu vykazuje katalytickou aktivitu nebo působí jako transkripční faktor.



Obrázek 1.2: Mechanismus regulace sensorů hemu. Vazba molekuly hemu na sensorovou doménu představuje prvotní signál, který je doprovázen změnou její struktury. Tato strukturální reorganizace představuje druhotný signál, který způsobí konformační změnu funkční domény, což má poté vliv na její aktivitu. Vytvořeno podle předlohy [20] a upraveno.

Senzory hemu se vyznačují flexibilitou, která významně přispívá k jejich správné funkci. Většina sensorových domén těchto proteinů je z větší části neuspořádaná. Avšak v důsledku extenzivních konformačních změn doprovázejících asociaci hemu na sensorovou doménu nebo jeho disociaci se mohou vytvářet strukturální motivy, přičemž jsou tyto změny dále přeneseny do funkční domény [31,32]. Flexibilita sensorů hemu se rovněž projevuje tím, že v případě mutace axiálního ligandu hemu jsou tyto senzory schopny asociovat s hemem pomocí postranních skupin nedalekých aminokyselin, které mohou sloužit jako ligandy hemu. Při záměně jednoho ligandu nedochází ke změně absorpčního spektra příslušných hemoproteinů. Ke změně schopnosti těchto proteinů

asociovat s hemem, kterou lze pozorovat změnou spekter v ultrafialovo-viditelné (UV-VIS) oblasti elektromagnetického záření, dochází až po záměně minimálně dvou potenciálních axiálních ligandů hemu [19,33].

Ve většině senzorů hemu se jako axiální ligand hemu uplatňuje thiolátová skupina cysteinu [25]. Ten může být součástí CP motivu [20], kde je v aminokyselinové sekvenci následován prolinem [34]. Prolin může ovlivnit vazebné vlastnosti hemu například tím, že reguluje flexibilitu thiolátové skupiny cysteinu. To zpravidla vede k zeslabení síly vazby mezi cysteinem a atomem železa hemu [20,25]. Často se v proteinech, které detekují hem, vyskytuje větší počet CP motivů, avšak pouze některé z nich slouží jako vazebná místa pro hem [25]. Naopak v jiných senzorech hemu se nachází CP motiv, se kterým hem neasociuje. Nelze tedy příslušný protein začlenit do skupiny senzorů hemu pouze na základě přítomnosti tohoto motivu v jeho řetězci. Některé senzory hemu CP motiv vůbec neobsahují a pro detekci hemu používají například cystein sám o sobě. Kromě cysteinu mohou sloužit jako axiální ligandy hemu jiné aminokyseliny, například histidin [30].

Vzhledem k tomu, že interakce thiolátové skupiny cysteinu s hemovým atomem železa ve stavu Fe(III) je poměrně slabá [31], může hem snadno a rychle disociovat ze sensorové domény [25]. Díky tomu jsou tyto proteiny schopny efektivně reagovat na koncentrační změny hemu uvnitř buněk. Pokud je v buňce deficit hemu, nedochází k jeho vazbě na sensorový protein, a volný hem může být využit pro jiné potřebné fyziologické funkce. Naopak v případě jeho nadbytku je navázán na senzor hemu [20].

Jedním z podstatných rysů sensorových hemoproteinů, které detekují hem, je vliv oxidačně-redukčního stavu hemového atomu železa na sílu interakce tohoto atomu s negativně nabitým postranním řetězcem cysteinu. V přítomnosti iontu železa hemu ve stavu Fe(III) je interakce silnější, než by tomu bylo v případě atomu ve stavu Fe(II), který je slaběji nabitý. U některých senzorů hemu byla po redukci hemového atomu železa ze stavu Fe(III) na Fe(II) zaznamenána substituce ligandů hemu [25]. Díky této substituci, kdy novým axiálním ligandem bývá imidazolová skupina histidinu, mohou senzory hemu v důsledku konformačních změn obou domén reagovat na redoxní podmínky uvnitř buňky [20].

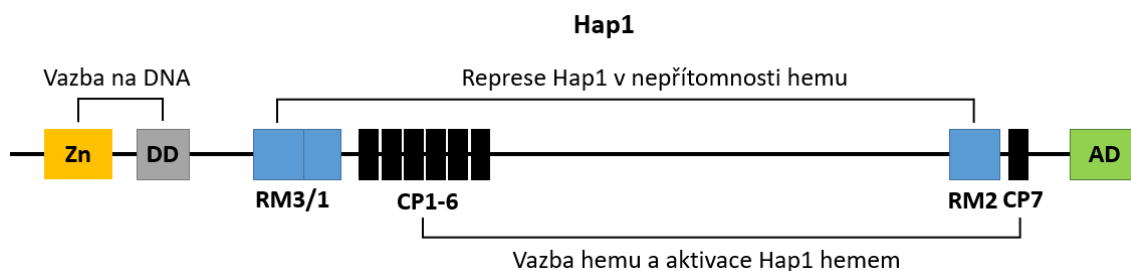
Skupina senzorů hemu má celou řadu zástupců, mezi které patří mimo jiné transkripční faktory Bach1 (z anglického názvu „broad-complex, tramtrack, bric-a-brac and cap'n'collar homologue 1“) a Hap1 (z anglického názvu „heme activator protein“) [30,35–37]. Proteinu Hap1 je věnována následující kapitola (1.3.1).

1.3.1 Transkripční faktor Hap1

Protein Hap1 pochází z organismu *Saccharomyces cerevisiae* a jedná se o eukaryotický transkripční faktor, který plní důležitou úlohu při regulaci exprese genů nezbytných pro respiraci a kontrolu oxidativního poškození [38]. Reguluje například expresi cytochromu *c1* a katalasy [39].

Aktivace Hap1 je regulována hemem, kdy s rostoucí koncentrací hemu v buňce vzrůstá také aktivita Hap1 [39,40]. V nepřítomnosti hemu vytváří Hap1 v jádře komplexy vyššího řádu s jinými proteiny. Hlavními partnery asociujícími s Hap1 jsou zde proteiny teplotního šoku, například Hsp90 (z anglického názvu „90 kDa heat shock protein“). Hap1 navázaný v tomto komplexu asociuje s DNA s nízkou afinitou, čímž je inhibována transkripce [34,41,42]. Interakcí hemu s Hap1 dochází ke konformačním změnám komplexu, které umožňují jeho aktivaci. Aktivní Hap1 se následně s vysokou afinitou váže na DNA jako dimer a může zahájit transkripci [38,39].

Struktura Hap1 je schematicky znázorněna na obrázku 1.3. V blízkosti N-konce je umístěn motiv zinkového klastru a dimerizační doména. Tyto funkční prvky jsou zodpovědné za vazbu Hap1 na DNA. Dále protein obsahuje sedm CP motivů. Sedmý v pořadí je jediným vazebným místem pro molekulu hemu. Zbylých šest CP motivů pravděpodobně napomáhá při aktivaci Hap1 vazbou hemu [25,39]. V proteinu Hap1 se dále vyskytují tři represivní moduly [43], které při nízkých koncentracích hemu potlačují jeho aktivitu [40]. V C-terminální části se nachází funkční doména, která je označována jako kyselá aktivační doména [36].



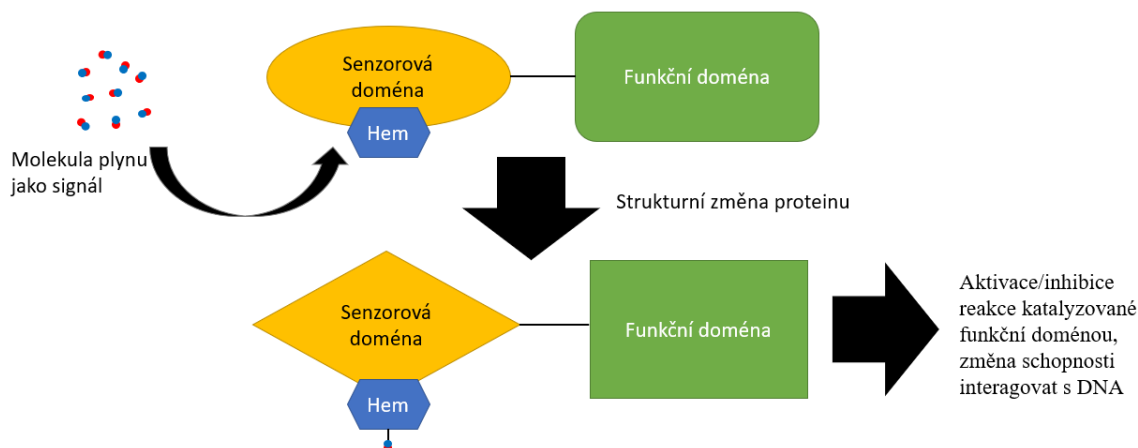
Obrázek 1.3: Schematické znázornění funkčních prvků transkripčního faktoru Hap1. Zinkový klastr (Zn) a dimerizační doména (DD) umožňují vazbu Hap1 (z anglického názvu „heme activator protein“) na DNA. Represivní moduly (RM) potlačují aktivitu Hap1 při deficitu hemu. Šest Cys-Pro (CP) motivů napomáhá při aktivaci Hap1 hemem. Sedmý CP motiv (CP7) slouží jako vazebné místo pro molekulu hemu. Aktivační doména (AD) je funkční doménou Hap1. Vytvořeno podle předlohy [43] a upraveno.

1.4 Senzorové hemoproteiny detekující plyny

Hemové senzory plynů se vyskytují zejména v prokaryotických organismech, avšak jejich přítomnost byla pozorována také v případě savců. Tyto proteiny jsou schopny detekovat dvouatomové plynné molekuly ve svém bezprostředním okolí [44,45]. Na základě tohoto vnějšího podnětu pak mohou regulovat fyziologické funkce probíhající v organismech [29]. Často detekovanými plynnými molekulami jsou molekula kyslíku, molekula oxidu dusnatého nebo molekula oxidu uhelnatého. V závislosti na typu plynu, který detekují, lze hemové senzory plynů členit do tří podskupin (vizte kap. 1.4.1, 1.4.2 a 1.4.3) [44,45].

V sensorové doméně těchto proteinů je vázán hem, jehož centrální ion železa funguje jako vazebné místo pro molekuly plynů [25]. K interakci s molekulou kyslíku nebo oxidu uhelnatého může docházet pouze v případě, kdy je ion ve stavu Fe(II). Molekula oxidu dusnatého asociuje s hemem bez ohledu na oxidační stav atomu železa, tj. ve stavu Fe(II) nebo Fe(III) [44]. Sensorová doména je obvykle lokalizována v N-terminální části polypeptidového řetězce a funkční doména je přítomna v jeho C-terminální části [44,46]. V případě některých sensorů plynů byla dokumentována přítomnost sensorové domény v centrální oblasti proteinu [47].

Aktivita hemových sensorů plynů je ovlivňována interakcí molekuly plynu s iontem železa hemu. Asociací nebo disociací této molekuly dochází k aktivaci, popřípadě inhibici hemoproteinu [29,44]. Během procesu regulace (vizte obr. 1.4, str. 20) je prvním signálem právě vazba molekuly plynu na atom železa hemu nebo naopak disociace z něj. To způsobí strukturní změnu sensorové domény, která představuje druhý signál. Ten je následně přenesen do funkční domény, která taktéž změní svoji strukturu a vyvolá specifickou buněčnou odezvu [44]. Funkční doména těchto proteinů reguluje aktivaci či inhibici transkripce [29], může též mít enzymovou aktivitu, jako například fosfodiesterasovou nebo diguanylátcyklasovou [25].



Obrázek 1.4: Mechanismus regulace hemových sensorů plynů. Molekula plynu interaguje s hemem vázaným v sensorové doméně, v důsledku čehož nastane změna konformace domény. V odpovědi na tuto změnu dojde ke konformační reorganizaci funkční domény, která se následně projeví změnou její aktivity. Vytvořeno podle předlohy [20] a upraveno.

1.4.1 Sensorové hemoproteiny detekující oxid uhelnatý

Oxid uhelnatý je toxický plyn, který je do atmosféry uvolňován například při sopečné činnosti. Endogenně produkováný v malém množství může plnit důležité funkce ve většině živých soustav [48,49]. Eukaryota využívají oxid uhelnatý, jenž vzniká hlavně při katabolismu hemu, jako signální molekulu nebo neurotransmitter. Některé bakterie využívají tento plyn jako zdroj energie pro růst nebo také jako signální molekulu [48].

Mezi zástupce této skupiny patří enzym cystathionin β -synthasa, která pomáhá degradovat toxický homocystein v organismu člověka tím, že ho využívá jako výchozí látku pro syntézu cystathioninu. Akumulace homocysteinu, která může být způsobena vrozenou mutací enzymu, vede k patologickému stavu hyperhomocysteinemie, jenž bývá doprovázen komplikacemi postihujícími kardiovaskulární nebo centrální nervový systém [50].

1.4.2 Sensorové hemoproteiny detekující oxid dusnatý

Prekurzorem syntézy oxidu dusnatého je u savců L-arginin. Reakce je katalyzována NO-synthasou a kromě oxidu dusnatého při ní vzniká ještě citrulin [51]. Oxid dusnatý se v živočišných organismech uplatňuje jako signální molekula a podílí se mimo jiné na regulaci krevního tlaku nebo imunitní odpovědi [52,53].

Příkladem senzoru oxidu dusnatého je solubilní guanylátcyklasa (sGC), která je schopna katalyzovat přeměnu guanosin-5'-trifosfátu (GTP) na cyklický guanosin-3',5'-monofosfát (cGMP) [53]. Druhý posel cGMP se účastní mnoha životně

důležitých dějů, reguluje například vasodilataci nebo buněčné dělení [44,54]. V sensorové doméně sGC se nachází H-NOX doména (z anglického názvu „heme-nitric oxide binding domain“), ve které je vázán hem. Aktivita sGC je zvýšena po interakci atomu železa hemu ve stavu Fe(II) s oxidem dusnatým [55,56].

1.4.3 Sensorové hemoproteiny detekující kyslík

Kyslík se řadí mezi stěžejní plyny, které se uplatňují při metabolismu nejen prokaryot, ale i eukaryot. V rámci oxidační fosforylace slouží jako konečný akceptor elektronů. Pokud je však pouze částečně redukován, vytváří toxické volné radikály, které jsou označovány jako reaktivní formy kyslíku [57]. Signalizace kyslíkem je zásadní především pro organismy, které mohou využívat aerobního i anaerobního metabolismu. Jedná se zejména o bakterie a archea, jejichž hemové senzory kyslíku jsou poměrně dobře charakterizovány.

Senzorové domény těchto proteinů se vyznačují třemi odlišnými strukturními motivy. Jedná se o globinovou doménu, GAF doménu [44] (akronym vytvořený z anglických názvů proteinů, ve kterých byl tento motiv poprvé rozpoznán: „cGMP-specific phosphodiesterases“, „*Anabaena* adenyl cyclases“ a „*Escherichia coli* (*E. coli*) formate hydrogenlyase transcriptional activator“ [58]) a PAS doménu [44] (akronym vytvořený z anglických názvů proteinů, ve kterých byl tento motiv poprvé identifikován: „*Drosophila* period clock protein“, „vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ a „*Drosophila* single minded protein“ [57]). Na základě různého strukturního uspořádání sensorové domény se hemové senzory kyslíku rozdělují do tří skupin (vizte kap. 1.4.3.1, 1.4.3.2 a 1.4.3.3) [44].

1.4.3.1 Senzory kyslíku obsahující globinovou doménu

Pro označení této skupiny hemoproteinů se často využívá zkratka GCS, která je odvozena od anglického názvu „globin-coupled oxygen sensor“. GCS se účastní regulace mnoha buněčných pochodů. Většina z funkčních domén GCS vykazuje katalytickou aktivitu [59] (například regulace homeostázy druhých poslů [60], účast ve fosforylačních kaskádách [61,62] nebo při tvorbě biofilmu [63]).

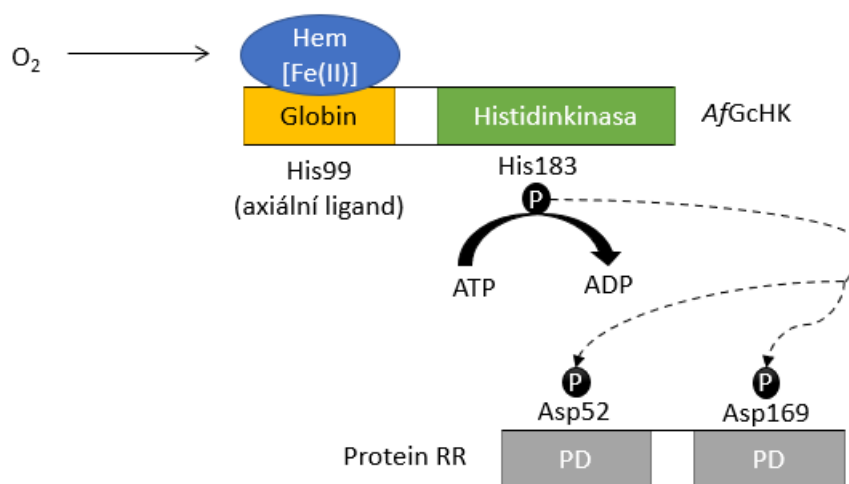
Senzorová globinová doména, umístěná na N-konci GCS, je složena z několika konzervovaných α -helixů a má obdobné strukturní uspořádání jako hemoprotein myoglobin, který je tvořen osmi α -helixy (A–H) [59,61,64]. V porovnání s myoglobinem chybí sensorové doméně GCS helix D a také část helixu E [59,61]. Tímto zkráceným

uspořádáním je pravděpodobně usnadněna detekce molekuly kyslíku [59,64]. Jako proximální ligand iontu železa hemu, který je vázán v kapse tvořené helixy C, E, F a G, často slouží histidin umístěný v helixu F [61].

K zástupcům GCS náleží diguanylátcyklasa YddV a histinkinasa *AfGcHK*. Protein YddV pochází z *E. coli* a je nazván podle genu *yddv*, který ho kóduje [44]. *AfGcHK* byla poprvé izolována z bakterie *Anaeromyxobacter* sp. (kmen Fw109-5) [62].

Proximálním ligandem iontu železa hemu v sensorové doméně *AfGcHK* je His99. Na distální straně hemu je přítomen Tyr45, který vytvořením vodíkové vazby stabilizuje interakci molekuly kyslíku a atomu železa hemu ve stavu Fe(II). Vazbou molekuly kyslíku na tento atom dochází ke zvýšení aktivity enzymu *AfGcHK* [62], který je schopen autofosforylace a také fosforylace regulátoru odpovědi, proteinu RR (z anglického názvu „response regulator“). V genomu *Anaeromyxobacter* se gen pro *AfGcHK* nachází nedaleko od genu pro RR [61].

Mechanismus působení *AfGcHK* je znázorněn na obrázku 1.5. Po asociaci molekuly kyslíku s iontem železa hemu ve stavu Fe(II) v sensorové doméně *AfGcHK* dochází k autofosforylaci His183. Posléze *AfGcHK* přenáší fosfátovou skupinu na Asp52 a Asp169 proteinu RR [59], které se nacházejí v jeho přijímacích doménách. Protein RR, který byl aktivován fosforylací, může v buňce následně ovlivnit další procesy [65].



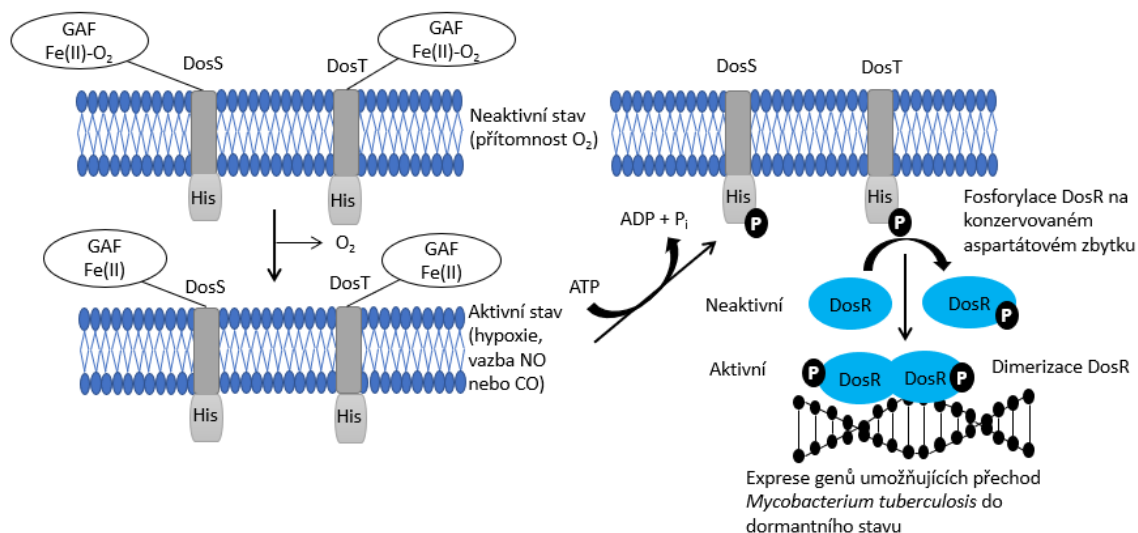
Obrázek 1.5: Mechanismus působení histidinkinasy izolované z bakterie *Anaeromyxobacter* (*AfGcHK*). Asociací molekuly kyslíku s iontem železa hemu ve stavu Fe(II) v sensorové globinové doméně *AfGcHK* dochází k aktivaci funkční histidinkinasové domény, což následně vyústí v autofosforylaci *AfGcHK* na His183. *AfGcHK* poté zprostředkovává přenos fosfátů (P) na Asp52 a Asp169, které jsou součástí přijímacích domén (PD) proteinu RR (z anglického názvu „response regulator“). Nakonec může protein RR ovlivnit další procesy. Vytvořeno podle předlohy [59] a upraveno.

1.4.3.2 Senzory kyslíku obsahující GAF doménu

GAF domény jsou součástí mnoha prokaryotických i eukaryotických proteinů. Doména je složena z pěti β -skládaných listů v antiparalelním uspořádání, které jsou navzájem pospojovány čtyřmi α -helixy. Toto uspořádání formuje prostor pro vazbu ligandu nebo kofaktoru (například cGMP, 2-oxoglutarát anebo hem) [44,66]. Další odstavce jsou zaměřeny na proteiny s GAF doménami, které jako kofaktor využívají právě hem.

Zástupci skupiny senzorů, které obsahují GAF doménu vážící hem, jsou proteiny DosT a DosS z patogenního mikroorganismu *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Oba proteiny mají podobnou strukturu a způsob vazby hemu [44]. Jsou v nich přítomny dvě tandemově uspořádané GAF domény, které se nacházejí v N-terminální sensorové doméně. Pouze k jedné z GAF domén je vázán hem jako prostetická skupina. Na C-konci proteinů jsou umístěny dvě funkční domény [67] – histidinkinasa a adenosin-5'-trifosfát hydrolyzující [68]. DosS a DosT jsou spolu s transkripčním faktorem DosR, který působí jako regulátor odpovědi, součástí dvousložkového signálního systému *M. tuberculosis*. Přesněji je součástí tohoto systému vždy DosR a dále buď protein DosS, nebo DosT [25,67]. Signální systém umožňuje bakterii detekovat plynné molekuly (kyslík, oxid dusnatý nebo oxid uhelnatý). Ta tak může reagovat na změny ve složení okolního prostředí a vstoupit například do dormantního stavu [69], který je pro bakterii velice výhodný, protože může způsobovat opakované infekce a navíc na ni nepůsobí většina dostupných chemoterapeutik [68].

Jak již bylo zmíněno výše, přechod *M. tuberculosis* do dormantního stavu je zprostředkován signálním systémem DosR a DosS nebo DosT. Signalizační kaskáda (vizte obr. 1.6, str. 24) je zahájena disociací molekuly kyslíku (hypoxií) z atomu železa hemu ve stavu Fe(II) v sensorové doméně histidinkinasy DosS nebo DosT, popřípadě vazbou oxidu uhelnatého nebo oxidu dusnatého na tento atom [69]. To vede k autofosforylaci histidinu buď DosS, nebo DosT a následné fosforylaci aspartátu proteinu DosR, který jakožto regulátor odpovědi posléze asociuje s DNA a indukuje transkripci genů zajišťujících přechod *M. tuberculosis* do dormantního stavu [70]. Inhibice DosT nebo DosS by měla zabránit tomuto přechodu, a omezit tak čas nutný pro léčení tuberkulózy. DosS a DosT jsou tedy perspektivními cíli pro vývoj nové generace antituberkulotik [71].



Obrázek 1.6: Mechanismus působení dvousložkového signálního systému bakterie *Mycobacterium tuberculosis*. Odštěpení molekuly kyslíku od atomu železa hemu ve stavu Fe(II) (popřípadě vazbou oxidu dusnatého nebo oxidu uhelnatého na tento atom) v GAF sensorové doméně histidinkinasy DosS nebo DosT vede k autofosforylaci histidinového zbytku buď DosS, nebo DosT. Posléze dochází k fosforylaci aspartátu regulátoru odpovědi DosR, jenž následně indukuje transkripci genů zajišťujících přechod *Mycobacterium tuberculosis* do dormantního stavu. Vytvořeno podle předlohy [72] a upraveno.

1.4.3.3 Senzory kyslíku obsahující PAS doménu

PAS domény jsou hojně obsaženy v proteinech, které jsou lokalizovány v cytosolu prokaryotických a eukaryotických buněk (včetně těch lidských). Tyto proteiny mají v organismech nepostradatelnou funkci především v signální transdukcii [57]. PAS doména je složena přibližně ze sta aminokyselin, které vytváří konzervovanou trojrozměrnou strukturu [73], tvořenou pěti nebo šesti β -skládanými listy v antiparalelním uspořádání a několika přilehlými α -helixy. PAS doména se svojí velikostí i prostorovým uspořádáním podobá GAF doméně. Jsou tedy pravděpodobně evolučně spřízněny navzdory jejich odlišné sekvenci aminokyselin [74,75].

Proteiny s PAS doménami jsou schopny detekovat rozličné signály. Díky tomu mohou organismy sledovat nejen intracelulární změny, ale také změny ve složení extracelulárního prostředí [57]. Specifita detekce může být (částečně) zabezpečena vazbou rozdílných ligandů nebo kofaktorů do PAS domény [57,73]. Vazba ligandu je buď prvotním signálem, na nějž protein reaguje, nebo protein detekuje pomocí kofaktoru druhotné signály (například plynné molekuly nebo elektromagnetické záření). Příklady ligandů či kofaktorů, se kterými je PAS doména schopna asociovat, jsou karboxylové kyseliny (malát), hem (typu *b* nebo *c*) nebo dvojmocné ionty kovů [73]. Další odstavce se soustředí na proteiny s PAS doménami, které jako kofaktor využívají hem.

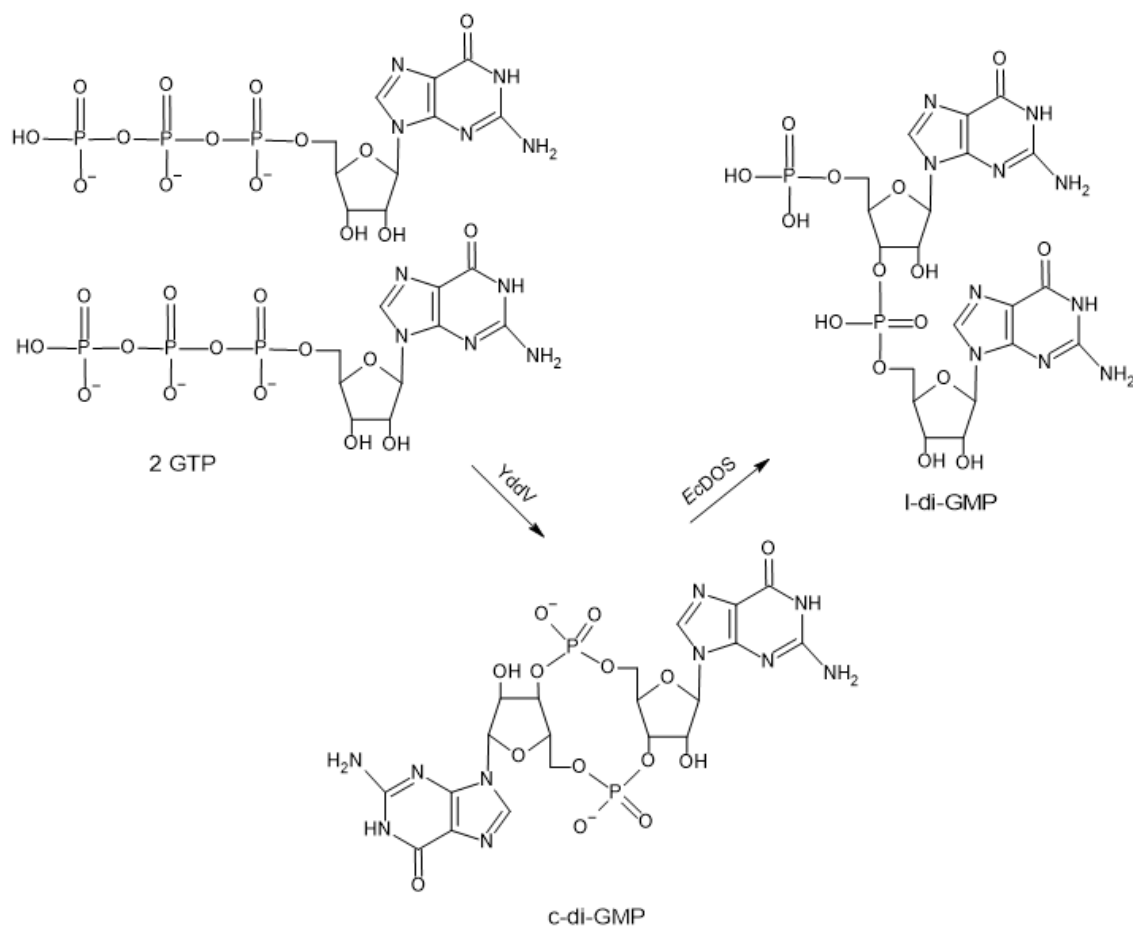
Asociace dvouatomových molekul s iontem železa hemu vyvolává strukturní změnu aminokyselinových zbytků, které tvoří kapsu pro navázání hemu v sensorové doméně proteinu [76]. Ve většině PAS domén se signál šíří β -skládanými listy a dále prostřednictvím α -helixů až do funkční domény proteinu [77].

Funkční domény, které se nacházejí v proteinech s PAS doménou, mají různé úlohy. Některé z nich zprostředkovávají protein-proteinové interakce, jiné vykazují enzymovou aktivitu. Příkladem mohou být fosfodiesterasové funkční domény [57]. V hemových kyslíkových senzorech, které jsou typické pro prokaryotické organismy, je PAS doména detekčním místem pro molekulu kyslíku. Významným zástupcem této skupiny hemoproteinů je přímý kyslíkový senzor z bakterie *E. coli*, *EcDOS*. Jeho pojmenování je odvozeno od anglického názvu „*Escherichia coli* direct oxygen sensor“ [44]. O tomto hemoproteinu podrobněji pojednává další kapitola (1.5).

1.5 Fosfodiesterasa *EcDOS*

EcDOS plní v *E. coli* stěžejní úlohu. Substrátem tohoto enzymu je totiž cyklický bis-(3',5')-guanosinmonofosfát (c-di-GMP), jenž se v prokaryotických organismech uplatňuje jako druhý posel [78]. Mezi zásadní fyziologické procesy, na jejichž regulaci se podílí, patří buněčná diferenciaci, mezibuněčná komunikace nebo tvorba biofilmu [79].

EcDOS společně s jiným kyslíkovým senzorem, *YddV*, který však náleží k GCS, pomáhá udržovat homeostázu c-di-GMP [44]. Oba proteiny jsou kódovány stejným operonem, *dosCP* [78], a často spolu vytvářejí komplex [80]. *EcDOS* katalyzuje štěpení c-di-GMP, jehož produktem je linearizovaná forma substrátu, l-di-GMP. Diguanylátcyklasa *YddV* katalyzuje vznik c-di-GMP ze dvou molekul GTP [44] (vizte obr. 1.7, str. 26). Biosyntéza c-di-GMP je rychlost limitujícím krokem těchto dvou spřažených reakcí [81]. Úloha obou enzymů při udržování homeostázy c-di-GMP v *E. coli* závisí na koncentraci kyslíku v prostředí [44]. Navázání molekuly kyslíku na hemový atom železa ve stavu Fe(II) v sensorové doméně obou proteinů vede k jejich aktivaci [82]. Vazebná afinita *EcDOS* ke kyslíku je přibližně pětikrát nižší než v případě *YddV* [83]. *YddV* se tedy pravděpodobně uplatňuje při semianaerobních podmínkách prostředí a detekuje změny ve stopových koncentracích kyslíku, zatímco *EcDOS* působí při aerobních podmínkách a reaguje na pokles koncentrace kyslíku [59]. Rozdíl ve vazebné afinitě pro kyslík pak napomáhá preciznímu ovlivnění aktivity obou enzymů [83].



Obrázek 1.7: Reakce katalyzované kyslíkovými senzory YddV a *EcdOS*. YddV katalyzuje přeměnu dvou molekul guanosin-5'-trifosfátu (GTP) na cyklický bis-(3',5')-guanosinmonofosfát (c-di-GMP). Poté *EcdOS* linearizuje tuto molekulu na l-di-GMP. Vytvořeno podle předlohy [27] v programu ChemSketch [7] a upraveno.

Hemoprotein *EcdOS* je tvořen 807 aminokyselinami, obsahuje N-terminální sensorovou doménu a C-terminální funkční doménu [83,84]. V sensorové doméně, PAS-A (1. až 139. aminokyselina polypeptidového řetězce *EcdOS* [85]), je vázán hem. Za PAS-A doménou je umístěna doména PAS-B (141. až 256. aminokyselina polypeptidového řetězce *EcdOS* [83]), která udržuje vhodné uspořádání domény PAS-A nezbytné pro vazbu hemu [83,84]. PAS-A doména je složena z pěti β -skládaných listů (A, B, G, H, I) a šesti α -helixů, ze kterých pět je označeno C, D, E, F a F' a šestý helix umístěný na N-konci této domény je označen II α [85,86]. Kapsu, ve které je vázán hem, vytváří helix F na proximální straně a β -skládané listy G a H na distální straně hemu [86]. *EcdOS* s atomem železa hemu ve stavu Fe(II), respektive Fe(III) bude dále v textu označován jako *EcdOS* Fe(II), respektive *EcdOS* Fe(III). Proximálním axiálním ligandem hemového atomu železa proteinu *EcdOS* Fe(II) i *EcdOS* Fe(III) je His77 [86]. Distálním ligandem iontu železa hemu *EcdOS* Fe(II) je Met95 a v případě *EcdOS* Fe(III)

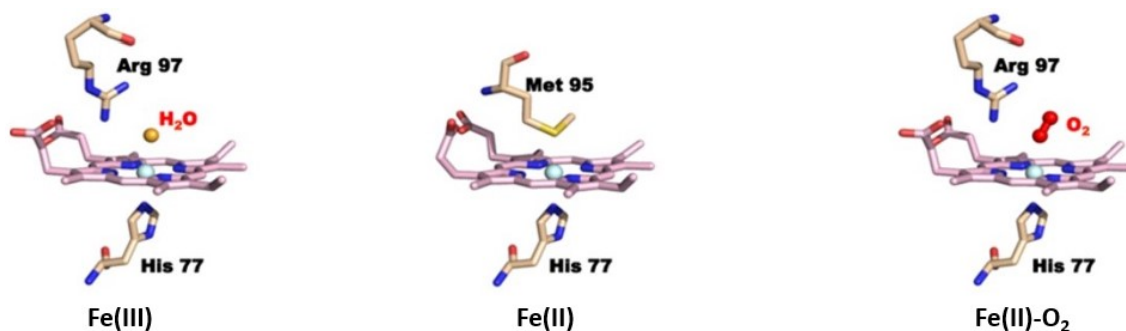
je distálním ligandem hydroxidový anion či molekula vody [83,85]. Mutací His77 ztrácí *EcDOS* schopnost vázat hem [84]. Izolovaná PAS-A doména vytváří homodimery, ve kterých se distální strany hemu nachází naproti sobě. Interakční rozhraní je tvořeno helixem II α a β -skládanými listy H a I [85,86]. *EcDOS* ve své C-terminální funkční doméně obsahuje domény GGDEF (410. až 540. aminokyselina polypeptidového řetězce *EcDOS* [87]) a EAL (549. až 803. aminokyselina polypeptidového řetězce *EcDOS* [87]). Tyto domény jsou součástí některých proteinů v prokaryotických organismech a jsou nazývány podle konzervované sekvence aminokyselin, která se v nich vyskytuje [88,89]. GGDEF doména *EcDOS* je katalyticky neaktivní. EAL doména vykazuje fosfodiesterasovou aktivitu [44,83,89] a je tvořena osmi α -helixy ($\alpha 1$ – $\alpha 8$), pěti smyčkami (L1–L5) a osmi β -skládanými listy ($\beta 1$ – $\beta 8$). Pro aktivitu *EcDOS* jsou stěžejní aminokyseliny (například Glu584, Arg588, Asn643, Asp705 a Asp706), které jsou umístěny v aktivním místě a koordinují substrát c-di-GMP a ionty kovů (například hořečnatý kationt). Součástí β -struktury označované $\beta 2$ je EAL motiv (Glu584–Ala–Leu586), který vytváří spodní část vazebného místa pro substrát. S prvním fosfátem c-di-GMP interaguje postranní řetězec aminokyseliny Asn643, s druhým fosfátem pak postranní řetězec aminokyseliny Arg588. Součástí smyčky L5 jsou aminokyseliny Asp705 a Asp706, které koordinují dvojmocné ionty kovů sloužící jako kofaktory *EcDOS*. Postranní řetězec Lys726, který se nachází v β -struktuře $\beta 6$, se pravděpodobně podílí na aktivaci molekuly vody nezbytné pro hydrolyzu c-di-GMP. V neaktivní konformaci *EcDOS* část smyčky L3 nejspíše brání přístupu substrátu do aktivního místa. Interakční rozhraní EAL domén, které je důležité pro intramolekulární přenos signálu, je tvořeno dvěma antiparalelními helixy, $\alpha 5$ a $\alpha 6b$ [90].

Hemoprotein *EcDOS* Fe(III) je nejméně aktivní, zatímco *EcDOS* Fe(II) vykazuje pouze částečnou aktivitu [44,91]. Asociací exogenních axiálních ligandů s iontem železa hemu *EcDOS* Fe(II) nebo *EcDOS* Fe(III) je aktivita tohoto enzymu stimulována [83]. V případě vazby molekuly kyslíku, oxidu uhelnatého nebo oxidu dusnatého na atom železa hemu *EcDOS* Fe(II) je aktivita zvýšena šestkrát až sedmkrát [92]. Zvýšení katalytické aktivity bylo pozorováno také v případě axiálních ligandů iontu železa hemu *EcDOS* Fe(III) – imidazolu, kyanidového nebo hydrogensulfidového aniontu [91,93]. Apofорма *EcDOS*, mutantní protein neobsahující His77 a postrádající schopnost vázat hem, vykazuje podobnou katalytickou aktivitu jako holoforma s navázanými exogenními axiálními ligandy hemu [91]. Přítomnost hemu v PAS-A doméně tedy pravděpodobně

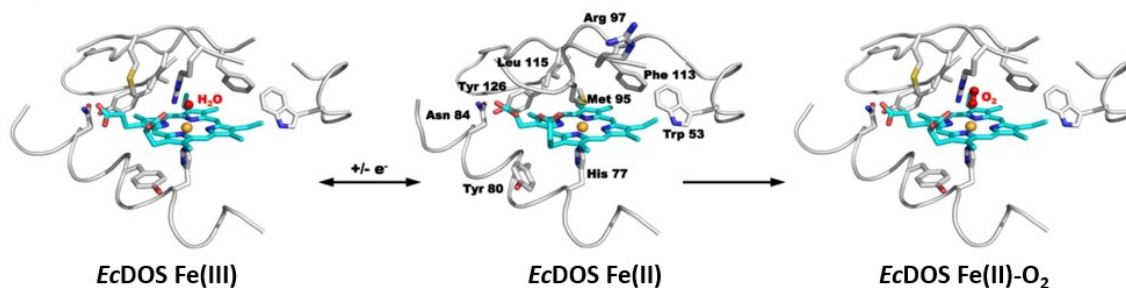
potlačuje katalýzu a vazba exogenního axiálního ligandu, například molekuly kyslíku, na atom železa hemu opět obnovuje katalytickou aktivitu [44].

Přenos signálu prostřednictvím *EcDOS* vede k rozsáhlým konformačním změnám, které většinou souvisí se změnou oxidačně-redukčního stavu iontu železa hemu nebo s vazbou ligandu na tento ion [44]. Změny, které probíhají v těsné blízkosti molekuly hemu, jsou vyobrazeny na obrázcích 1.8 a 1.9 (str. 29). PAS-A doména *EcDOS* Fe(III) je relativně flexibilní – především FG smyčka na distální straně hemu [83]. Redukce hemového iontu železa *EcDOS* ve formě Fe(III) na formu Fe(II) je doprovázena změnou flexibility proteinu [44] a také nahrazením distálního axiálního ligandu hemu, hydroxidového aniontu či molekuly vody, za postranní řetězec Met95. Zároveň na distální straně hemu dochází k přeuspořádání vodíkových vazeb [85], které se nově vytváří mezi Met95 a jednou z propionátových skupin hemu a prostřednictvím molekuly vody také mezi Gly94 a Phe113. Tyto vazby patrně zabráňují výraznějšímu pohybu FG smyčky [85,86]. Mimo jiné dochází ke změnám na interakčním rozhraní PAS-A domén, na nichž se podílejí především Phe113, Leu115 a Ser116 [85]. Tyto změny zahrnují například tvorbu vodíkové vazby mezi Phe113 první podjednotky a Arg131 druhé podjednotky [85,92].

Jak již bylo zmíněno výše, vazba molekuly plynu, například kyslíku, ovlivňuje aktivitu *EcDOS* [91,93], neboť nahrazuje Met95 jako distální axiální ligand hemu [92]. *EcDOS* s atomem železa hemu ve stavu Fe(II) koordinovaný molekulou kyslíku bude dále v textu označován jako *EcDOS* Fe(II)-O₂. Po vytvoření tohoto komplexu nedochází na proximální straně hemu k rozsáhlejšímu strukturním změnám a aminokyselina His77 zůstává jeho proximálním ligandem. Postranní řetězec Tyr80 se otáčí o 115° [83]. Naopak na distální straně hemu vyvolává interakce molekuly kyslíku s atomem železa hemu *EcDOS* Fe(II) výrazné strukturní změny, které jsou lokalizovány hlavně v FG smyčce, dále ve β-skládaném listu G a smyčce HI [86] a zahrnují především aminokyseliny Met95 a Arg97 [83]. Po vazbě molekuly kyslíku k atomu železa hemu se guanidinová skupina Arg97 přetáčí o téměř 180° a nově směřuje k hemu [94]. Arg97 stabilizuje vazbu Fe(II)-O₂ tím, že vytváří s molekulou kyslíku silnou vodíkovou vazbu [95]. Obdobným způsobem přispívá ke stabilizaci této vazby také Phe113 [92]. Po navázání distálního axiálního ligandu hemu se také vytváří síť vodíkových můstků mezi propionátovými skupinami hemu, Asn84 a Arg97. Strukturní změny se přenáší z těchto propionátových skupin do smyčky FG, která následně změní svoji konformaci [83].



Obrázek 1.8: Koordinační struktura centrálního iontu železa hemu v PAS-A doméně proteinu *EcDOS* v jeho různých oxidačně-redukčních nebo ligandových stavech. Distálním axiálním ligandem atomu železa hemu ve stavu Fe(III) je molekula vody, ve stavu Fe(II) je to Met95 a v případě komplexu Fe(II)-O₂ je to molekula kyslíku. Arg97 slouží jako interakční místo pro molekulu kyslíku. Axiálním ligandem hemu na proximální straně je ve všech třech případech His77. Převzato z [44].



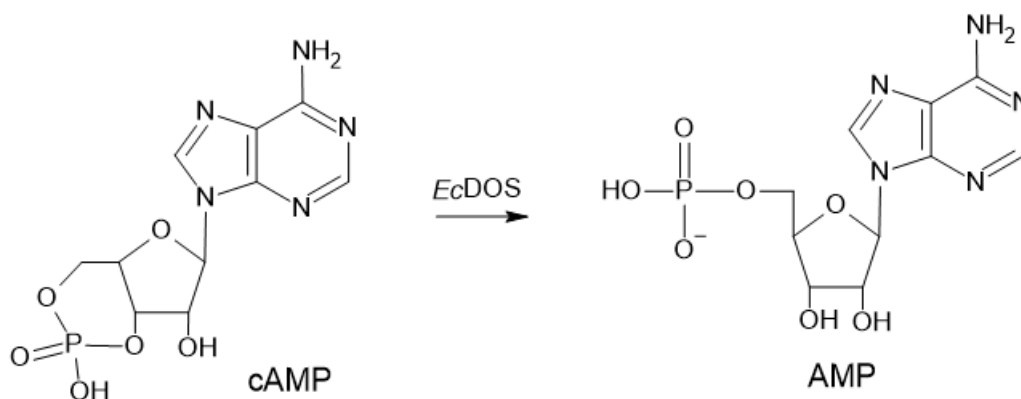
Obrázek 1.9: Struktura okolí hemu v proteinu *EcDOS* v různých oxidačně-redukčních nebo ligandových stavech centrálního atomu železa hemu v PAS-A doméně. Každý z těchto přechodů je doprovázen rozsáhlými strukturálními změnami. Proximálním axiálním ligandem je ve všech třech případech His77. Redukce centrálního atomu železa hemu ze stavu Fe(III) na Fe(II) vede k záměně distálního axiálního ligandu, molekuly vody, za Met95, který vytváří vodíkovou vazbu s propionátovou skupinou hemu. Vazba molekuly kyslíku na ion železa hemu ve stavu Fe(II) způsobí disociaci Met95 z tohoto iontu. Arg97 slouží jako interakční místo pro molekulu kyslíku. Také se vytváří síť vodíkových vazeb, která zahrnuje Arg97, Asn84 a propionátové skupiny hemu. Na proximální straně hemu se mění pozice postranního řetězce Tyr80. Převzato z [44].

Distální strana hemu v PAS-A doméně patrně interaguje s povrchem funkční domény. Změna konformace *EcDOS* na distální straně hemu, která je vyvolána vazbou axiálního ligandu na centrální atom železa hemu, může vést k intramolekulárnímu přenosu signálu [44,83]. V EAL doméně poté pravděpodobně dochází ke strukturální změně smyček L3 a L5, což umožňuje vazbu substrátu do aktivního místa a následnou katalýzu [90].

EcDOS v nativním stavu, tj. *EcDOS* Fe(III), a apofорма *EcDOS* (mutantní protein *EcDOS* His77Ala, který není schopen vázat hem) byly pomocí gelové permeační chromatografie dle starší studie charakterizovány jako tetramery [84]. Lechavue a kolektiv v novější studii využili pro stanovení oligomerního stavu *EcDOS* metodu

gelové permeační chromatografie ve spojení s víceúhlovým rozptylem světla a navrhli, že *EcDOS* Fe(III), se vyskytuje ve formě dimeru [92]. Přítomnost dimerní nebo tetramerní formy enzymu v roztoku je nezbytná pro katalýzu, která pravděpodobně probíhá až po interakci mezi EAL doménami *EcDOS* [84,85].

EcDOS je schopen vyjma degradace c-di-GMP katalyzovat také štěpení cAMP [96] (vizte obr. 1.10). Při reakci vzniká adenosin-5'-monofosfát (AMP). Číslo přeměny pro cAMP je přibližně třístokrát nižší než pro c-di-GMP [83]. Aktivita enzymu pro cAMP je ovlivněna oxidačně-redukčním stavem hemového atomu železa [85] a hydrolýza cAMP se uskutečňuje jen v případě *EcDOS* Fe(II), nikoli *EcDOS* Fe(III) [96]. Degradaci cAMP je schopna katalyzovat také apoforma *EcDOS* (mutantní protein His77Ala, který není schopen vázat hem) [83].



Obrázek 1.10: Hydrolýza cyklického adenosin-3',5'-monofosfátu (cAMP) katalyzovaná hemoproteinem *EcDOS* Fe(II). Při této reakci vzniká adenosin-5'-monofosfát (AMP). Vytvořeno podle předlohy [83] v programu ChemSketch [7] a upraveno.

2 Cíle diplomové práce

Pro předkládanou diplomovou práci byly vytyčeny níže uvedené cíle:

- Shrnutí dosavadních poznatků známých z literatury o mechanismu přenosu signálu v proteinu *EcDOS* a příbuzných senzorech.
- Rekombinantní exprese a purifikace proteinu *EcDOS* (přirozená forma) a mutantního proteinu *EcDOS His77Ala* (apoforma proteinu *EcDOS*).
- Spektrofotometrická charakterizace *EcDOS* a *EcDOS His77Ala* a jejich různých oxidačně-redukčních a ligandových stavů atomu železa hemu v sensorové doméně proteinu *EcDOS*.
- Stanovení oligomerních stavů různých forem proteinu *EcDOS* (*EcDOS* Fe(III), *EcDOS* Fe(II)-O₂ a *EcDOS His77Ala*) za různých podmínek (různé způsoby temperování preparátu, přítomnost substrátu c-di-GMP).
- Studium strukturní dynamiky *EcDOS* ve dvou různých oxidačně-redukčních a ligandových stavech iontu železa hemu (ve formě Fe(III) a Fe(II)-O₂) a jeho apoformy, *EcDOS His77Ala*, pomocí metody vodíko-deuteriové výměny ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS).

3 Přístroje, materiál a použité metody

3.1 Použité přístroje

Analytická ultracentrifuga:	Optima LE-80K, Beckman Coulter
Analytické váhy:	HM-200, A&D Instruments LTD
Autokláv:	MLS-3781L, PHCbi
Bezdotykový kahan:	Gasprofi 2 SCS, WLD-TEC
Centrifugační filtry:	Amicon Ultra, Merck Millipore
Centrifugy:	Avanti JXN-26, Beckman Coulter Z 383 K, Hermle Labortechnik Allegro X-30R, Beckman Coulter Gilson, GmCLab 5415 D, Eppendorf
Elektroforetická aparatura:	Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad
Chladnička:	LI7, Indesit
Chromatografické kolony:	Superdex 200 10/300 GL, GE Healthcare SecurityGuard ULTRA Fully Porous Polar C18 2,1 mm, Phenomenex Luna Omega Polar C18 100 × 1,0 mm, 1,6 μm, Phenomenex
Hmotnostní spektrometr:	15T solariX XR, Bruker Daltonics
Inkubátory:	Mini Dry Bath, MD-MINI, Major Science IB-01E, JEIO TECH, Schoeller Instruments
Laboratorní třepačky:	ES-60 Incubator Shaker, MIULab Multitron Standard, INFORS HT WIZARD, Velp Scientifica
Laboratorní váhy:	HM-200, A&D Instruments 440-35N, KERN
Laminární box:	BIO 126, Labox
Magnetické míchačky:	C-MAG MS 7, IKA VARIOMAG Electronicrührer MONO, H + P Labortechnik
Mikrovlnná trouba:	KOR-6L05, Daewoo
Mikrovlnný autokláv:	Microjet, Enbio Technology
Mrazicí box (-20 °C):	M60.0, Calex
Mrazicí box (-80 °C):	MDF-U53V, SANYO TwinCool ULT Freezer, Haier Biomedical
pH metr:	1100 L, VWR Phenomenal

Rotační třepačka:	Chemos Group
Skener:	Perfection V550 Photo, Epson
Spektrofotometry:	DS-11 Spectrophotometer, DeNovix Cary 60 UV-VIS, Agilent technologies Infinite M200 PRO, TECAN
Chromatografické systémy:	ÄKTAprime plus, GE Healthcare Agilent 1290 (Agilent Technologies)
Ultrazvukový homogenizátor:	Sonopuls HD 3100, sonda KE 76, Bandelin
Zdroj deionizované vody:	Milli-Q Plus system, Millipore
Zdroj pro elektroforézu:	PowerPac Basic Power Supply, Bio-Rad

3.2 Použitý materiál a chemikálie

BIOCEV, ČR:	pepsin, nepenthesin-2
Bio-Rad, USA:	Precision Plus Protein TM Unstained Standard
Carl Roth, Německo:	leupeptin, aprotinin, pepstatin A
Expedeon, Velká Británie:	InstantBlue Protein Stain
Fluka, Švýcarsko:	lysozym, tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), dodecylsírán sodný (SDS), akrylamid, N,N'-methylen-bis-akrylamid (BIS), 2-merkapt ethanol
Fluka, USA:	močovina
GE Healthcare, USA:	TALON Superflow
Lachema, ČR:	kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), imidazol, peroxidisírán amonný, bromfenolová modř, ethanol
Lach-Ner, ČR:	hydrogenfosforečnan draselný, glycerol, dihydrogenfosforečnan draselný, kyselina chlorovodíková, chlorid sodný, dimethylsulfoxid (DMSO)
Linde, ČR:	dusík
Oxoid, USA:	Bacto Yeast Extract, Bacto Tryptone
Penta, ČR:	dithioničitan sodný, glycin
Serva, Německo:	fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)

Sigma-Aldrich, USA:	Luria-Bertani (LB) Broth, Luria-Bertani Agar, kanamycin sulfát, isopropyl β -1-D-thiogalaktopyranosid (IPTG), hemin, myoglobin, Protein Standard Mix (15-600 kDa), c-di-GMP, tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP)
Supelco, UK:	kyselina mravenčí, acetonitril, voda (kvalita pro kapalinovou chromatografii s hmotnostní spektrometrií – LC-MS)
Stratagen, USA:	kmen BL-21 (DE3) <i>E. coli</i>
Thermo Scientific, USA:	Pierce BCA Protein Assay Kit
VWR International, USA:	thiomčovina, oxid deuteria

Všechny komerčně pořízené chemikálie byly obstarány v nejvyšším dostupném stupni čistoty.

Plazmidy pET28a(+)/*Ec*DOS a pET28a(+)/*Ec*DOS His77Ala byly poskytnuty laboratoří profesora Toru Shimizu, Ph.D. z Univerzity Tohoku v Sendai, Japonsko.

3.3 Použité metody

3.3.1 Příprava agarových ploten

Pro všechny experimenty, které jsou popsány níže (v této a následující kapitole), byl využit roztok LB agaru o koncentraci $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a LB média o koncentraci $25 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Před dalším použitím byly oba roztoky sterilizovány v mikrovlnném autoklávu (Microjet, Enbio Technology) při teplotě $121 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 20 minut.

Rozehřátím v mikrovlnné troubě (KOR-6L05, Daewoo) byl LB agar rozpuštěn. Po jeho mírném zchladnutí byl přemístěn do laminárního boxu (BIO 126, Labox), ve kterém bylo převedeno potřebné množství agaru (vždy 10 ml agaru na přípravu jedné agarové plotny) do sterilní zkumavky Falcon. K agaru byl následně pipetován takový objem antibiotika kanamycinu (koncentrace zásobního roztoku $50 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), aby finální koncentrace tohoto antibiotika v agaru činila $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (vždy 10 μl kanamycinu na přípravu jedné agarové plotny). Po promíchání byla takto vzniklá směs aplikována po 10 ml na příslušný počet sterilních Petriho misek, které byly ponechány v laminárním boxu po dobu 1 hodiny.

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

Kompetentní kmen BL-21 (DE3) bakterií *E. coli*, plazmidy pET-28a(+)/*EcDOS* a pET-28a(+)/*EcDOS* His77Ala byly ponechány rozmraznout v nádobě s vodou a ledem. V laminárním boxu (BIO 126, Labox) bylo do každé ze tří sterilních mikrozkušavek Eppendorf přidáno 25 μl kompetentních buněk. Do jedné z mikrozkušavek byl pipetován 1 μl roztoku plazmidu pET-28a(+)/*EcDOS* (koncentrace 150 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), respektive 1 μl roztoku plazmidu pET-28a(+)/*EcDOS* His77Ala (koncentrace 141 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$). Postup stanovení koncentrace plazmidové DNA je uveden v kapitole 3.3.5. Obsah poslední mikrozkušavky bez přidaného plazmidu sloužil jako negativní kontrola. Vně laminárního boxu byly všechny tři mikrozkušavky ponechány v nádobě s ledem a vodou po dobu 30 minut. Poté byly buňky inkubovány při teplotě 42 °C (Mini Dry Bath, MD-MINI, Major Science) po dobu 45 sekund. Následovala inkubace buněk v nádobě s ledem a vodou po dobu 5 minut. Následně bylo v laminárním boxu do každé z mikrozkušavek přidáno 200 μl LB média. Po dobu 1 hodiny byly buňky inkubovány při teplotě 37 °C (ES-60 Incubator Shaker, MIULab). Obsah mikrozkušavek byl následně aplikován na předem přichystané agarové plotny (vizte kap. 3.3.1) s obsahem kanamycinu o koncentraci 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a rozprostřen rovnoměrně po celé jejich ploše. Po vsáknutí buněčné suspenze do agaru (přibližně 45 minut) byly tyto plotny ponechány inkubovat (umístěné dnem vzhůru) po dobu 18 hodin při teplotě 37 °C (IB-01E, JEIO TECH, Schoeller Instruments). Poté byly plotny uzavřeny parafilmem a uchovány v chladničce (LI7, Indesit) před jejich dalším použitím.

3.3.3 Exprese proteinu *EcDOS*, respektive *EcDOS* His77Ala v buňkách *E. coli* BL-21 (DE3)

Do potřebného počtu sterilních zkumavek Falcon bylo v laminárním boxu (BIO 126, Labox) přidáno vždy 5 ml LB média a 5 μl antibiotika kanamycinu (výsledná koncentrace 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Z každé z agarových ploten, na kterých se nacházely kolonie buněk BL-21 (DE3) bakterie *E. coli* transformované buď plazmidem pET28a(+)/*EcDOS*, nebo plazmidem pET28a(+)/*EcDOS* His77Ala (vizte kap. 3.3.2), byly vybrány dvě tyto kolonie. Vybrané kolonie byly následně s využitím sterilních dřevěných tyčinek a vyžíhané pinzety přesunuty do zkumavek, které obsahovaly LB médium s kanamycinem. Obsah těchto zkumavek byl následně inkubován po dobu 18 hodin při teplotě 37 °C a při 220 otáčkách za minutu (RPM – z anglického názvu „revolutions per

minute“) v laboratorní třepačce (ES-60 Incubator Shaker, MIULab). Po uplynutí této doby byly obsahy zkumavek připravené k inokulaci TB média.

Pro přípravu TB média, ve kterém probíhala exprese obou proteinů, byl nejdříve připraven požadovaný objem vodného roztoku obsahujícího $26,7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Bacto Yeast Extract a $13,3 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Bacto Tryptone. Tento roztok byl převeden po 450 ml do Erlenmayerových baněk, jejichž hrdla byla následně uzavřena alobalem. Roztoky v těchto baňkách byly sterilizovány (MLS-3781L, PHCbi) po dobu 20 minut při teplotě $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně byl připraven požadovaný objem vodného roztoku hydrogenfosforečnanu draselného o koncentraci $0,72 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; dihydrogenfosforečnanu draselného o koncentraci $0,17 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 0,4% (v/v) glycerolu. Po filtraci tohoto roztoku přes filtrační papír následovala jeho sterilizace (MLS-3781L, PHCbi) po dobu 20 minut při teplotě $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byl tento roztok po 50 ml převeden do baněk, které každá obsahovaly 450 ml roztoku Bacto Yeast Extract a Bacto Tryptone.

Do každé baňky s 0,5 l TB média bylo pipetováno 0,5 ml kanamycinu (výsledná koncentrace $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a poté 0,5 ml LB média s obsahem buněk BL-21 (DE3) transformovaných buď plazmidem pET28a(+)/*Ec*DOS, nebo plazmidem pET28a(+)/*Ec*DOS His77A1a. Obsah baněk byl následně inkubován při teplotě $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a 160 RPM (Multitron Standard, INFORS HT), dokud se hodnota optické denzity bakteriální suspenze při 600 nm nepohybovala v rozmezí od 0,6 do 1,2. Tato veličina byla měřena pomocí metody „OD₆₀₀“ na spektrofotometru DS-11 (DeNovix). Po docílení požadované hodnoty optické denzity byly směsi v baňkách inkubovány po dobu 1 hodiny při 140 RPM (Multitron Standard, INFORS HT) a při teplotě $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Posléze bylo do každé z baněk pipetováno 0,1 ml IPTG (koncentrace zásobního roztoku $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), čímž byla indukována exprese proteinu *Ec*DOS, respektive *Ec*DOS His77A1a. Směsi v baňkách byly dále inkubovány při 130 RPM (Multitron Standard, INFORS HT) a teplotě $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 19 hodin. Následovala centrifugace buněk (Avanti JXN-26, rotor JLA-9.1000, poloměr rotoru 13,4 cm, Beckman Coulter) při 6500 RPM a teplotě $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 minut. Po centrifugaci byly bakteriální pelety zváženy (HM-200, A&D Instruments) a před jejich dalším použitím skladovány při teplotě $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (MDF-U53V, SANYO).

3.3.4 Izolace proteinu *EcDOS*, respektive *EcDOS His77Ala* z buněk *E. coli* BL-21 (DE3)

Buňky *E. coli* obsahující protein *EcDOS*, nebo buňky obsahující protein *EcDOS His77Ala* byly po dobu přibližně 20 minut inkubovány při laboratorní teplotě a poté k nim byl přidán resuspendační pufr (100 mmol·l⁻¹ NaCl; 50 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 8,0; 1 mmol·l⁻¹ PMSF; 1 mmol·l⁻¹ EDTA; 0,2 mg·ml⁻¹ lysozym; 5 μg·ml⁻¹ aprotinin, 5 μg·ml⁻¹ leupeptin, 5 μg·ml⁻¹ pepstatin A). K 5 g buněk bylo přidáno přibližně 23 ml tohoto pufru. Ultrazvukovou sonikací suspenze buněk obsahující buď exprimovaný protein *EcDOS*, nebo protein *EcDOS His77Ala* byly buňky dezintegrovány. Během sonikace (Sonopuls HD 3100, sonda KE 76, Bandelin) byla suspenze buněk umístěna na ledu a nepřetržitě míchána (C-MAG MS 7, IKA). Sonikace byla pro každou suspenzi buněk opakována celkem šestkrát a probíhala po dobu 1 minuty při amplitudě 55 %. Mezi jednotlivými sonikačními úseky byla přestávka, která trvala 45 sekund.

V případě *EcDOS* byl k homogenizátu přidán takový objem roztoku heminu v DMSO (koncentrace 5 mmol·l⁻¹), aby finální koncentrace heminu v homogenizátu činila 300 μmol·l⁻¹ (k 50 ml homogenizátu byly přidány 3 ml roztoku heminu). Získaná směs byla inkubována za nepřetržitého míchání (VARIOMAG Electronicrührer MONO, H + P Labortechnik) při teplotě 4 °C a po dobu 20 minut. Při izolaci *EcDOS His77Ala* byla inkubace s heminem vynechána.

Následovala ultracentrifugace lyzovaných buněk při 55 000 RPM (Optima Le-80K, rotor 70 Ti, poloměr rotoru 6,57 cm, Beckman Coulter) a při teplotě 4 °C po dobu 70 minut. Ze supernatantů byly odebrány vzorky v objemu 20 μl pro diskontinuální elektroforézu v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsiranu sodného (SDS-PAGE), která byla provedena dle kapitoly 3.3.8.

Prvním purifikačním krokem byla afinitní chromatografie, pro kterou byla využita přítomnost hexahistidinové kotvy zařazené na N-konci sekvence proteinu *EcDOS*, respektive jeho mutované varianty *EcDOS His77Ala*. Afinitní nosič (TALON Superflow, GE Healthcare) o celkovém objemu 6 ml (zahrnutý také 3 ml ochranné vrstvy) byl ekvilibrován s využitím centrifugace (Z 383 K, rotor 220.86 V01, poloměr rotoru 16,6 cm, Hermle Labortechnik) při 200 RPM a při teplotě 4 °C. Roztok nad usazeným nosičem byl před každou 2minutovou centrifugací odstraněn a ke zbývajícimu nosiči bylo přidáno 8 ml ekvilibračního pufru (100 mmol·l⁻¹ NaCl; 50 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 8,0). Tento krok (včetně centrifugace za totožných podmínek) byl opakován celkem

tříkrát. Před poslední, čtvrtou, centrifugací byly přidány 3 ml ekvilibračního pufru ke 3 ml afinitního nosiče. Následně byl ekvilibrovaný nosič o objemu 3 ml inkubován se supernatantem obsahujícím protein *EcDOS*, respektive *EcDOS His77Ala*. Tato inkubace probíhala za nepřetržitého míchání (Chemos Group) při teplotě 4 °C po dobu 1 hodiny. Po dokončení inkubace byly výsledné směsi převedeny na dvě chromatografické kolony s fritami, které byly předem promyty přibližně 150 ml deionizované vody. Obě směsi byly ponechány protéct chromatografickou kolonou. Z obou frakcí, které obsahovaly látky neinteragující s afinitním nosičem, bylo odebráno po 20 µl vzorku pro SDS-PAGE (vizte kap. 3.3.8). Následně byl každý afinitní nosič promyt přibližně 50 ml ekvilibračního pufru (100 mmol·l⁻¹ NaCl; 50 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 8,0). Protein *EcDOS*, respektive *EcDOS His77Ala* zachycený na afinitním nosiči byl eluován 15 ml elučního pufru (100 mmol·l⁻¹ NaCl; 50 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 8,0; 200 mmol·l⁻¹ imidazol). Z frakcí eluovaných tímto pufrem byly následně odebrány vzorky pro SDS-PAGE v objemu 20 µl.

Eluát proteinu *EcDOS*, respektive *EcDOS His77Ala* byl koncentrován pomocí centrifugačního koncentrátoru Amicon Ultra (Merck Millipore) s membránou schopnou zachytit molekuly, jejichž molekulová hmotnost přesahuje 30 kDa. Centrifugace byla provedena při 4 000 RPM (Allegro X-30R, rotor SX4400, poloměr rotoru 10,1 cm, Beckman Coulter) a při teplotě 4 °C. Roztoky byly vždy po 2 minutách promíchány pomocí automatické pipety a centrifugovány, dokud objem každého z těchto roztoků nebyl snížen přibližně na 450 µl.

Závěrečný purifikační krok byl uskutečněn pomocí gelové permeační chromatografie (systém ÄKTAprime plus, kolona Superdex 200 10/300 GL, GE Healthcare). Průtok mobilní fáze (pufr A, 150 mmol·l⁻¹ NaCl; 20 mmol·l⁻¹ Tris, pH 8,0) byl 0,8 ml·min⁻¹. Tlak se pohyboval okolo 0,4 MPa. Kolona, dávkovací ventil a smyčka pro vzorek (objem 500 µl) byly nejprve promyty mobilní fází. Dále byl roztok proteinu *EcDOS*, respektive *EcDOS His77Ala* filtrován přes 0,22 µm membránový filtr. Poté bylo aplikováno 450 µl roztoku daného proteinu na kolonu. Průběh chromatografie byl zaznamenán měřením absorbance při 280 nm. Byly jímány frakce vykazující maximální absorbanci při 280 nm s proteinem *EcDOS* (rozsah elučních objemů 9 ml až 13,5 ml), respektive s jeho apoformou, *EcDOS His77Ala* (rozmezí elučních objemů 7,5 až 9,5 ml). Dále byl roztok příslušného proteinu koncentrován výše popsaným způsobem (s využitím centrifugačního filtru Amicon Ultra) přibližně na 300 µl. Z roztoku daného proteinu bylo odebráno 10 µl jako vzorku pro SDS-PAGE (vizte kap. 3.3.8). Finální preparáty proteinů

byly rozděleny do alikvotů, jejichž objem činil 10, 20 nebo 40 μl , poté zmrazeny v kapalném dusíku a před jejich dalším použitím uchovány při teplotě $-80\text{ }^\circ\text{C}$ (MDF-U53V, SANYO). Koncentrace proteinu *EcDOS* nebo *EcDOS His77A* ve finálním preparátu byla stanovena dle kapitoly 3.3.7.

3.3.5 Stanovení koncentrace plazmidové DNA

Koncentrace plazmidové DNA v roztoku byla stanovena pomocí metody „dsDNA“ (spektrofotometr DS-11, DeNovix) s využitím následujícího vzorce:

$$c_{DNA} = \frac{A_{260} \cdot CF}{l}, \quad (3.1)$$

ve kterém c_{DNA} označuje hmotnostní koncentraci plazmidové DNA ($\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), A_{260} představuje absorbanci při 260 nm, CF značí přepočítávací faktor (pro dvouřetězcovou DNA je $CF = 50\text{ ng}\cdot\text{cm}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) a l znamená optickou dráhu paprsku světla ($l = 0,05\text{ cm}$). Deionizovaná voda („blank“) i roztok plazmidové DNA byly na detekční plochu nanášeny v objemu 2 μl .

3.3.6 Stanovení koncentrace proteinu pomocí spektrofotometru DS-11 (DeNovix)

Koncentrace proteinu *EcDOS* ve formě Fe(II)-O₂ v roztoku byla stanovena s využitím spektrofotometru DS-11 (DeNovix) pomocí metody „Protein A280“. Pufř A ($150\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; $20\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, pH 8,0), který sloužil jako „blank“, i roztok hemoproteinu byly na detekční plochu nanášeny v objemu 2 μl . Koncentrace proteinu byla spektrofotometrem stanovena podle níže uvedeného vztahu:

$$c_{prot} = \frac{A_{280} \cdot M}{l \cdot \varepsilon_{280}}, \quad (3.2)$$

ve kterém c_{prot} označuje hmotnostní koncentraci proteinu *EcDOS* ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), A_{280} představuje absorbanci při 280 nm, M značí molekulovou hmotnost proteinu (pro *EcDOS* včetně histidinové kotvy je $M = 93\,004\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [87,97]), l znamená optickou dráhu paprsku světla ($l = 0,05\text{ cm}$) a ε_{280} je molární absorpční koeficient proteinu při 280 nm (pro *EcDOS* je $\varepsilon_{280} = 95\,840\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [87,97]).

3.3.7 Stanovení koncentrace proteinu pomocí metody používající bicinchoninovou kyselinu (BCA)

Koncentrace proteinu *EcDOS*, respektive *EcDOS His77Ala* v roztoku byla stanovena pomocí BCA metody. Pro tento účel byla využita sada Pierce Microplate BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) a 96jamková mikrotitrační destička. Do požadovaného počtu jamek této destičky bylo pipetováno po 9 μl slepého vzorku (v triplicátu), standardních roztoků (v duplikátu pro každou koncentraci) a zředěných vzorků příslušných proteinů (v triplicátu pro každé použité ředění). Do všech obsazených jamek bylo následně přidáno 260 μl pracovního činidla, které bylo předem připraveno smísením reagentu A (uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný, vinan sodný v $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ hydroxidu sodném, BCA) a reagentu B (4% w/v síran mědnatý) v poměru 50 : 1. Jako „blank“ sloužil pufr A ($150\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; $20\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, pH 8,0). Jako standard pro sestavení kalibrační závislosti byl použit hovězí sérový albumin. Použité koncentrace tohoto proteinu byly $0,125\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; $0,25\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; $0,50\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; $0,75\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; $1,00\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; $1,50\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $2,00\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Vzorky příslušných proteinů byly ředěny tak, aby jejich výsledná koncentrace spadala do intervalu $0,125\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ až $2,00\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Roztoky byly inkubovány po dobu 30 minut při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (IB-01E, JEIO TECH, Schoeller Instruments) a po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Poté byla měřena jejich absorbance při 562 nm (Infinite M200 PRO, TECAN). Koncentrace příslušného proteinu v roztoku byla stanovena dosazením do rovnice kalibrační křivky, která byla sestrojena podle naměřených hodnot absorbance standardních roztoků v závislosti na jejich koncentraci.

3.3.8 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného

Do sestavené aparatury pro SDS-PAGE (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad) byla umístěna čtyři předem odmaštěná skla (vždy dvě naproti sobě), která byla určena pro přípravu dvou jednomilimetrových gelů. Nejprve byla mezi skla pomocí automatické pipety převedena směs pro přípravu 10% separačních gelů. Tato směs byla složena ze 6,7 ml pufru B (0,1% w/v SDS; $0,375\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8,8), 3,3 ml polymeračního roztoku B (30% w/v akrylamid; 0,8% w/v BIS v pufru B), 10 μl TEMED a 100 μl peroxidisíranu amonného (koncentrace $100\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Následovalo převrstvení této směsi deionizovanou vodou, která byla po vytvoření separačních gelů (přibližně

35 minut) z povrchu směsi odstraněna. Směs pro vznik dvou 4% zaostřovacích gelů byla připravena smísením 3,5 ml pufru C (0,1 % w/v SDS; 0,125 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 8,8), 533 μl polymerizačního roztoku C (30 % w/v akrylamid; 0,8 % w/v BIS v pufru C), 4 μl TEMED a 80 μl peroxodisíranu amonného (koncentrace 100 mg·ml⁻¹). Tato směs byla s využitím automatické pipety navrstvena na separační gely. Dále byl mezi každá dvě skla vsunut hřeben, který sloužil k vytvoření jamek pro vzorky v zaostřovacím gelu. Po vytvoření zaostřovacích gelů (přibližně 20 minut) byly gely omyty a aparatura vložena do elektroforetické vany. Vana a aparatura byly naplněny elektrodočným pufrům (0,1% w/v SDS; 0,192 mol·l⁻¹ glycin; 0,025 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 8,3).

Vzorky odebrané v průběhu izolace (vizte kap. 3.3.4) byly zředěny a smíseny s odpovídajícím množstvím čtyřikrát koncentrovaného redukujícího vzorkového pufru (8 % w/v SDS; 0,25 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 6,8; 20 % v/v 2-merkptoethanol; 40 % v/v glycerol, 0,008 % w/v bromfenolová modř). Složení finálních roztoků vzorků je uvedeno v tab. 3.1 (str. 42). Tyto vzorky byly inkubovány při teplotě 100 °C (Mini Dry Bath, MD-MINI, Major Science) po dobu 5 minut a poté podrobena krátké centrifugaci (Gilson, GmCLab). Z jamek v zaostřovacích gelech byly vyjmuty hřebeny a následně do nich byly aplikovány příslušné vzorky (vizte tab. 3.1, str. 42) o objemu 20 μl (s výjimkou dvou vzorků výsledného preparátu příslušného proteinu) a 10 μl standardu (Precision Plus ProteinTM Unstained Standard). SDS-PAGE probíhala při napětí 200 V (PowerPac Basic Power Supply, Bio-Rad) po dobu 70 minut. Po dokončení SDS-PAGE byly odstraněny zaostřovací gely. Separací gely byly přeneseny na dobu 1 hodiny do barvicí lázně (InstantBlue Protein Stain) a následně byly pořízeny jejich obrazové záznamy (Perfection V550 Photo, Epson) pro pozdější vyhodnocení.

Tabulka 3.1: Složení vzorků pro diskontinuální elektroforézu v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE). Do jamek zaostřovacího gelu bylo pipetováno po 20 μl vzorků kromě finálního preparátu proteinu *EcDOS* nebo *EcDOS His77Ala*. V jejich případě bylo naneseno 5, 10 a 20 μl finálního preparátu do tří za sebou následujících jamek.

Typ vzorku	Objem odebraného vzorku [μl]	Objem vzorkového pufru [μl]	Objem deionizované vody [μl]	Hmotnost proteinu v jamce [μg]
Cytosolární frakce po ultracentrifugaci (izolace <i>EcDOS</i>)	2,50	5,00	12,50	neurčeno
Cytosolární frakce po ultracentrifugaci (izolace <i>EcDOS His77Ala</i>)	5,00	5,00	10,00	neurčeno
Cytosolární frakce nezachycená na afinitním nosiči (izolace <i>EcDOS</i>)	2,50	5,00	12,50	neurčeno
Cytosolární frakce nezachycená na afinitním nosiči (izolace <i>EcDOS His77Ala</i>)	5,00	5,00	10,00	neurčeno
Eluát proteinu <i>EcDOS</i> po afinitní chromatografii	7,50	5,00	7,50	neurčeno
Eluát proteinu <i>EcDOS His77Ala</i> po afinitní chromatografii	15,00	5,00	0	neurčeno
Výsledný preparát proteinu <i>EcDOS</i>	1,00	1,25	2,75	1,00
	2,00	2,50	5,50	2,00
	4,00	5,00	11,00	4,00
Výsledný preparát proteinu <i>EcDOS His77Ala</i>	1,20	1,25	2,55	1,00
	2,40	2,50	5,10	2,00
	4,80	5,00	10,20	4,00

3.3.9 Příprava proteinu *EcDOS* ve formě Fe(II)-O_2

Preparát proteinu *EcDOS* v nativním stavu, tj. *EcDOS Fe(III)*, získaný izolací dle postupu v kapitole 3.3.4 a skladovaný při $-80\text{ }^\circ\text{C}$, byl nejprve ponechán temperovat po dobu 90 minut v nádobě s ledem a vodou (teplota $0\text{ }^\circ\text{C}$). Následně bylo potřebné množství roztoku tohoto proteinu v nativním stavu při laboratorní teplotě ($20\text{ }^\circ\text{C}$) vystaveno působení redukčního činidla dithionicitanu sodného (finální koncentrace $10\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) po dobu 10 minut. Tím byl získán *EcDOS Fe(II)*. Pro odstranění redukčního činidla nebo jeho případných reakčních produktů byla využita odsolovací kolonka (PD midiTrap G-25, GE Healthcare), která byla předem ekvilibrována 35 ml pufru A ($150\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; $20\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, pH 8,0). Na tuto kolonku byl dále aplikován roztok *EcDOS*

s dithioničitanem sodným o celkovém objemu 100 μl a po vsáknutí tohoto roztoku bylo na kolonku dále aplikováno 900 μl pufru A (150 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, pH 8,0). *EcDOS* Fe(II) byl eluován 1,5 ml pufru A a následně vystaven působení vzduchu po dobu 10 minut. Tím byl atom železa hemu tohoto proteinu převeden ze stavu Fe(II) do stavu Fe(II)-O₂. Následně byl protein koncentrován pomocí centrifugačního koncentrátoru Amicon Ultra (Merck Millipore) s membránou schopnou zachytit proteiny, jejichž molekulová hmotnost přesahuje 30 kDa. Tato centrifugace (Allegro X-30R, rotor SX4400, poloměr rotoru 10,1 cm, Beckman Coulter) probíhala při 4 000 RPM a teplotě 4 °C. Roztok proteinu byl vždy po 2 minutách centrifugace (celkem přibližně 15 minut) promíchán pomocí automatické pipety, dokud nebylo dosaženo požadované koncentrace proteinu v roztoku. Koncentrace proteinu *EcDOS* s atomem železa hemu ve stavu Fe(II)-O₂ byla stanovena dle kapitoly 3.3.6.

3.3.10 Spektrofotometrická analýza proteinů *EcDOS* a *EcDOS* His77Ala

Absorpční spektra *EcDOS* Fe(III) a *EcDOS* Fe(II)-O₂ byla měřena při laboratorní teplotě (20 °C) v rozsahu vlnových délek 250 až 700 nm (Cary 60 UV-VIS, Agilent technologies) proti pufru A (150 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, pH 8,0). Protein *EcDOS* Fe(III) (nativní stav – získán izolací proteinu a skladovaný při -80 °C, MDF-U53V, SANYO, vizte kap. 3.3.4) byl nejprve ponechán temperovat po dobu 90 minut v nádobě s ledem a vodou (teplota 0 °C) a následně zředěn na výslednou koncentraci 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v 600 μl pufru A (150 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, pH 8,0). Forma *EcDOS* Fe(II)-O₂ byla získána postupem uvedeným v kapitole 3.3.9 a její koncentrace v 600 μl pufru A (150 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, pH 8,0) činila 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

V případě proteinu *EcDOS* His77Ala bylo také měřeno jeho absorpční spektrum při laboratorní teplotě (20 °C) v rozsahu vlnových délek 250 až 700 nm (Cary 60 UV-VIS, Agilent technologies) proti pufru A (150 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, pH 8,0), kterým byl daný preparát rovněž ředěn na požadovanou koncentraci. Preparát proteinu *EcDOS* His77Ala, který byl získán izolací (vizte kap. 3.3.4) a skladovaný při -80 °C (MDF-U53V, SANYO), byl nejprve ponechán temperovat po dobu 90 minut v nádobě s ledem a vodou (teplota 0 °C). Výsledná koncentrace proteinu *EcDOS* His77Ala v 600 μl pufru A (150 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, pH 8,0) byla 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Dále bylo měřeno absorpční spektrum 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku heminu v pufru A (zásobní roztok heminu v DMSO byl 3 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) v rozmezí vlnových délek 250 až 700 nm (Cary 60

UV-VIS, Agilent technologies). Nakonec byl k roztoku proteinu *EcDOS His77Ala* o koncentraci $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v 600 μl pufru A ($150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, pH 8,0) přidán 1 μl zásobního roztoku heminu (finální koncentrace $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Vzniklý roztok byl promíchán a po 10 minutách bylo měřeno jeho absorpční spektrum od 250 nm do 700 nm (Cary 60 UV-VIS, Agilent technologies). Všechna získaná spektra byla zpracována v programu Microsoft Excel.

3.3.11 Analytická gelová permeační chromatografie

Oligomerní stavy proteinů *EcDOS Fe(III)*, *EcDOS Fe(II)-O₂* a *EcDOS His77Ala* za různých podmínek (vizte níže) byly analyzovány pomocí separace gelovou permeační chromatografií na koloně Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) s využitím chromatografického systému ÄKTAprime plus (GE Healthcare). Průtok mobilní fáze (pufr A, $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, pH 8,0) byl při všech separacích $0,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a tlak dosahoval 0,4 MPa. Finální koncentrace příslušné formy proteinu v pufru A ($150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, pH 8,0) o celkovém objemu 100 μl byla $8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Kalibrace kolony byla provedena dle kapitoly 3.3.11.1. Vzorčky pro analýzu byly připraveny dle kapitoly 3.3.11.2. Před nanesením na kolonu byly jednotlivé vzorky (objem 100 μl) filtrovány přes 0,22 μm membránový filtr. Eluované proteiny byly detekovány měřením absorbance při 280 nm. Získané chromatogramy byly zpracovány v programu Microsoft Excel.

Molekulová hmotnost *EcDOS His77Ala*, *EcDOS Fe(III)* a *EcDOS Fe(II)-O₂* byla stanovena dosazením elučního objemu tohoto proteinu do rovnice kalibrační závislosti použité kolony. Poté byl určen poměr molekulové hmotnosti proteinu podle kalibrace kolony a teorií vypočtené molekulové hmotnosti proteinu, která byla zjištěna na základě jeho aminokyselinové sekvence [87,97].

3.3.11.1 Kalibrace kolony Superdex 200 10/300 GL

Pro kalibraci kolony Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) byl využit myoglobin (finální koncentrace $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, molekulová hmotnost 16,7 kDa) a dále směs standardních proteinů 15–600 kDa (Sigma-Aldrich) obsahující thyroglobulin ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, 670 kDa), γ -globulin ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, 150 kDa) a ovalbumin ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, 44,3 kDa), která byla rozpuštěna v 250 μl pufru A ($150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, pH 8,0). Myoglobin a směs standardních proteinů 15–600 kDa byly separovány zvlášť (při první separaci byl využit pouze roztok myoglobinu a při druhé separaci směs standardních proteinů

15–600 kDa). Kalibrační závislost byla určena vynesemím logaritmu molekulových hmotností těchto proteinů v závislosti na jejich elučním objemu (zpracováno v programu Microsoft Excel).

3.3.11.2 Příprava vzorků proteinů *EcDOS His77Ala*, *EcDOS Fe(III)* a *EcDOS Fe(II)-O₂* pro analýzu pomocí gelové permeační chromatografie

Finální preparáty proteinů *EcDOS* a *EcDOS His77Ala* byly po izolaci (vizte kap. 3.3.4) skladovány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (MDF-U53V, SANYO). Preparát *EcDOS Fe(III)* byl temperován pro analýzu pomocí gelové permeační chromatografie následujícími šesti způsoby – (a) jedna část preparátu byla nejprve inkubována při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (M60.0, Calex) po dobu 2 hodin, s bezprostředně následující inkubací při laboratorní teplotě ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$) po dobu 30 minut, (b) další část preparátu byla rovnou inkubována při teplotě $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (v nádobě s ledem a vodou) po dobu 4 hodin, s okamžitě následující inkubací při laboratorní teplotě ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$) po dobu 3 hodin, (c) následující část preparátu byla inkubována při teplotě $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (v nádobě s ledem a vodou) po dobu 3 hodin a tento preparát byl pak rovnou využit pro analýzu při teplotě $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, (d) další část preparátu byla inkubována při teplotě $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (v nádobě s ledem a vodou) po dobu 1,5 hodiny a tento preparát byl pak ihned využit pro analýzu při teplotě $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, (e) následující část preparátu byla inkubována při teplotě $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (v nádobě s ledem a vodou) po dobu 1 hodiny a tento preparát byl pak přímo využit pro analýzu při teplotě $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, (f) poslední část preparátu byla inkubována při teplotě $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (v nádobě s ledem a vodou) po dobu 30 minut a tento preparát byl pak rovnou využit pro analýzu při teplotě $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preparát proteinu *EcDOS His77Ala* byl temperován pro analýzu následujícími dvěma způsoby – (a) první část preparátu byla nejprve inkubována při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (M60.0, Calex) po dobu 2 hodin, s bezprostředně následující inkubací při laboratorní teplotě ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$) po dobu 0,5 hodiny, (b) druhá část preparátu byla inkubována při teplotě $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (v nádobě s ledem a vodou) po dobu 1,5 hodiny a tento preparát byl pak rovnou využit pro analýzu při teplotě $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

EcDOS ve formě Fe(II)-O_2 byl získán postupem uvedeným v kapitole 3.3.9.

Nakonec byl studován vliv substrátu c-di-GMP na oligomerní stav proteinů *EcDOS His77Ala*, *EcDOS Fe(III)* a *EcDOS Fe(II)-O₂*. Preparáty *EcDOS Fe(III)* a *EcDOS His77Ala* byly vyjmuty z hlubokomrazícího boxu ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, MDF-U53V, SANYO) a ponechány inkubovat při teplotě $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (v nádobě s ledem a vodou) po dobu 90 minut. Protein *EcDOS Fe(II)-O₂* byl získán postupem uvedeným v kapitole 3.3.9. Tyto formy

proteinů o koncentraci $8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ byly nejprve analyzovány pomocí gelové permeační chromatografie v nepřítomnosti c-di-GMP. Dále byl k roztoku příslušné formy proteinů přidán $1 \mu\text{l}$ c-di-GMP tak, aby jeho finální koncentrace v roztoku byla $8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (tj. poměr protein ku c-di-GMP byl 1 : 1). Po 5 minutách byly tyto vzorky aplikovány na kolonu. Tento experiment byl proveden dvakrát.

3.3.12 Vodíko-deuteriová výměna ve spojení s hmotnostní spektrometrií

Strukturní dynamika *EcDOS* Fe(III), *EcDOS* Fe(II)-O₂ a *EcDOS* His77Ala byla analyzována pomocí metody HDX-MS. Experimenty popsané v této kapitole byly provedeny ve spolupráci s Mgr. Pavlou Vaňkovou, Ph.D. a RNDr. Petrem Pompachem, Ph.D. z Biotechnologického a biomedicínského centra Akademie věd a Univerzity Karlovy. HDX reakce, LC-MS analýza a zpracování dat z této analýzy v programu DeutEx [98] byly provedeny Mgr. Pavlou Vaňkovou, Ph.D. Příprava preparátů příslušných forem proteinů, zpracování získaných dat v programu Microsoft Excel a jejich interpretace byla provedena předkladatelkou diplomové práce. Níže jsou popsány přípravy vzorků jednotlivých forem proteinů pro HDX-MS analýzu.

Před samotnou MS analýzou deuterovaných vzorků bylo provedeno peptidové mapování, jehož účelem bylo nalézt optimální podmínky štěpení, které poskytovaly dostatečné množství redundantních peptidů pokrývajících aminokyselinovou sekvenci proteinu *EcDOS*. Během mapování byly testovány odlišné typy aspartátových proteas. Pro analýzu bylo použito 100 pmol *EcDOS* Fe(III) ve $125 \mu\text{l}$ pufru A ($20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8,0; $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl), k němuž bylo přidáno $75 \mu\text{l}$ zhášecího pufru ($2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ thiomocovina; $6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ močovina; $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ glycin-HCl, pH 2,3; $400 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCEP). Tato analýza a její vyhodnocení byly provedeny RNDr. Petrem Pompachem, Ph.D.

Preparát proteinu *EcDOS* v nativním stavu, tj. *EcDOS* Fe(III), byl vyjmut z hlubokomrazícího boxu ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$, MDF-U53V, SANYO) a byl ponechán po dobu 90 minut v nádobě s ledem a vodou (teplota $0 \text{ }^\circ\text{C}$). Následně byla smícháním 400 pmol této formy proteinu v $100 \mu\text{l}$ pufru A ($20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8,0; $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl) s $400 \mu\text{l}$ pufru D ($20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl v D₂O; $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl v D₂O, pD 8,0) zahájena HDX. V příslušných časových intervalech (20 sekund, 2 minuty, 20 minut a 2 hodiny) bylo vždy z výše uvedené reakční směsi odebráno $125 \mu\text{l}$ roztoku obsahujícího 100 pmol *EcDOS* Fe(III). HDX byla ukončena přidáním $75 \mu\text{l}$ zhášecího

pufu (2 mol·l⁻¹ thiomočovina; 6 mol·l⁻¹ močovina; 1 mol·l⁻¹ glycin-HCl, pH 2,3; 400 mmol·l⁻¹ TCEP), přičemž 20sekundové a 20minutové HDX reakce byly provedeny v triplikátech. Ihned po smíchání se zhášecím pufrem byly všechny vzorky důkladně promíchány (WIZARD, Velp Scientifica) a zamraženy v kapalném dusíku. Takto připravené vzorky byly skladovány při -80 °C (TwinCool ULT Freezer, Haier Biomedical). Nedeuterovaný vzorek sloužící jako referenční kontrola obsahoval 100 pmol *EcDOS* Fe(III) ve 125 µl pufu A (20 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 8,0; 150 mmol·l⁻¹ NaCl). Tento vzorek byl následně smíchán se 75 µl zhášecího pufu (2 mol·l⁻¹ thiomočovina; 6 mol·l⁻¹ močovina; 1 mol·l⁻¹ glycin-HCl, pH 2,3; 400 mmol·l⁻¹ TCEP), bezprostředně poté zamražen v kapalném dusíku a skladován při -80 °C (TwinCool ULT Freezer, Haier Biomedical).

Protein *EcDOS* Fe(II)-O₂ byl získán postupem uvedeným v kapitole 3.3.9. Pro HDX-MS byla tato forma proteinu zpracována stejně jako v případě *EcDOS* Fe(III). Pro žádný z časových intervalů nebyly vzorky připraveny v replikátu.

Protein *EcDOS* His77Ala byl pro HDX-MS analýzu zpracován stejným postupem jako výše uvedené varianty proteinu *EcDOS*, přičemž 20sekundové a 20minutové výměnné reakce byly připraveny v triplikátu.

Všechny připravené vzorky, včetně vzorků pro peptidové mapování, byly analyzovány pomocí systému pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) Agilent 1290 (Agilent Technologies) připojeného k hmotnostnímu spektrometru (15T solariX XR, Bruker Daltonics). Součástí HPLC systému byla proteasová kolona naplněná matricí s koimobilizovaným pepsinem a nepenthesinem-2 (Laboratoř strukturní biologie a buněčné signalizace, BIOCEV), dále odsolovací kolona s reverzní fází (SecurityGuard ULTRA Fully Porous Polar C18 2,1 mm, Phenomenex) a analytická kolona s reverzní fází (Luna Omega Polar C18 100 × 1,0 mm, 1,6 µm, Phenomenex). Během analýzy byly všechny kolony umístěny v nádobě s ledem a vodou (teplota 0 °C), aby byla minimalizována zpětná výměna deuteria za vodík. Každý vzorek byl těsně před LC-MS analýzou rychle rozmražen a následně aplikován v objemu 200 µl do dávkovacího ventilu. V HPLC systému byl protein nejprve štěpen na proteasové koloně a následně došlo k odsolení vzniklých peptidů. Průtok mobilní fáze A (0,4 % v/v kyselina mravenčí ve vodě) byl 200 µl·min⁻¹. Po 3 minutách následovala separace peptidů na analytické koloně při průtoku mobilní fáze 40 µl·min⁻¹. Pro separaci peptidů bylo využito zvyšujícího se zastoupení organického rozpouštědla (acetonitrilu) v mobilní fázi. Tento gradient byl vytvořen smícháním mobilní fáze B (95% v/v acetonitril; 0,4 % v/v kyselina

mravenčí) a mobilní fáze C (2% v/v acetonitril; 0,4 % v/v kyselina mravenčí) v různých poměrech (vizte tab. 3.2). Po separaci v HPLC systému, který byl připojen k hmotnostnímu spektrometru, byly peptidy ionizovány elektrosprejem v pozitivním módu ionizace a následně analyzovány hmotnostním spektrometrem s využitím iontové cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací a detekovány.

Tabulka 3.2: Procentuální zastoupení mobilních fází B (95% v/v acetonitril; 0,4 % v/v kyselina mravenčí) a C (2% v/v acetonitril; 0,4 % v/v kyselina mravenčí) v čase při LC-MS analýze proteinu *EcDOS* nebo *EcDOS His77Ala*.

Čas [min]	Mobilní fáze B [%]	Mobilní fáze C [%]
0	10	90
2	10	90
8	35	65
9	99	1
14	99	1
15	10	90
20	10	90

Výsledky z hmotnostně-spektrometrické analýzy byly zobrazeny a zpracovány s využitím programu Compass Data Analysis, verze 5.3 (Bruker Daltonics). Data získaná z peptidového mapování pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie ve spojení s kapalinovou chromatografií (LC-MS/MS) byla v databázi MASCOT (Matrix Science) porovnána s aminokyselinovou sekvencí proteinu *EcDOS*. Data z LC-MS analýzy deuterovaných vzorků byla zpracována v programu DeutEx [98] a dále v programu Microsoft Excel. Deuterace příslušného peptidu, která byla vyjádřena v procentech, byla vztažena na nejvyšší možnou míru deuterace tohoto peptidu, která odpovídá počtu atomů vodíku v jeho amidových vazbách [99].

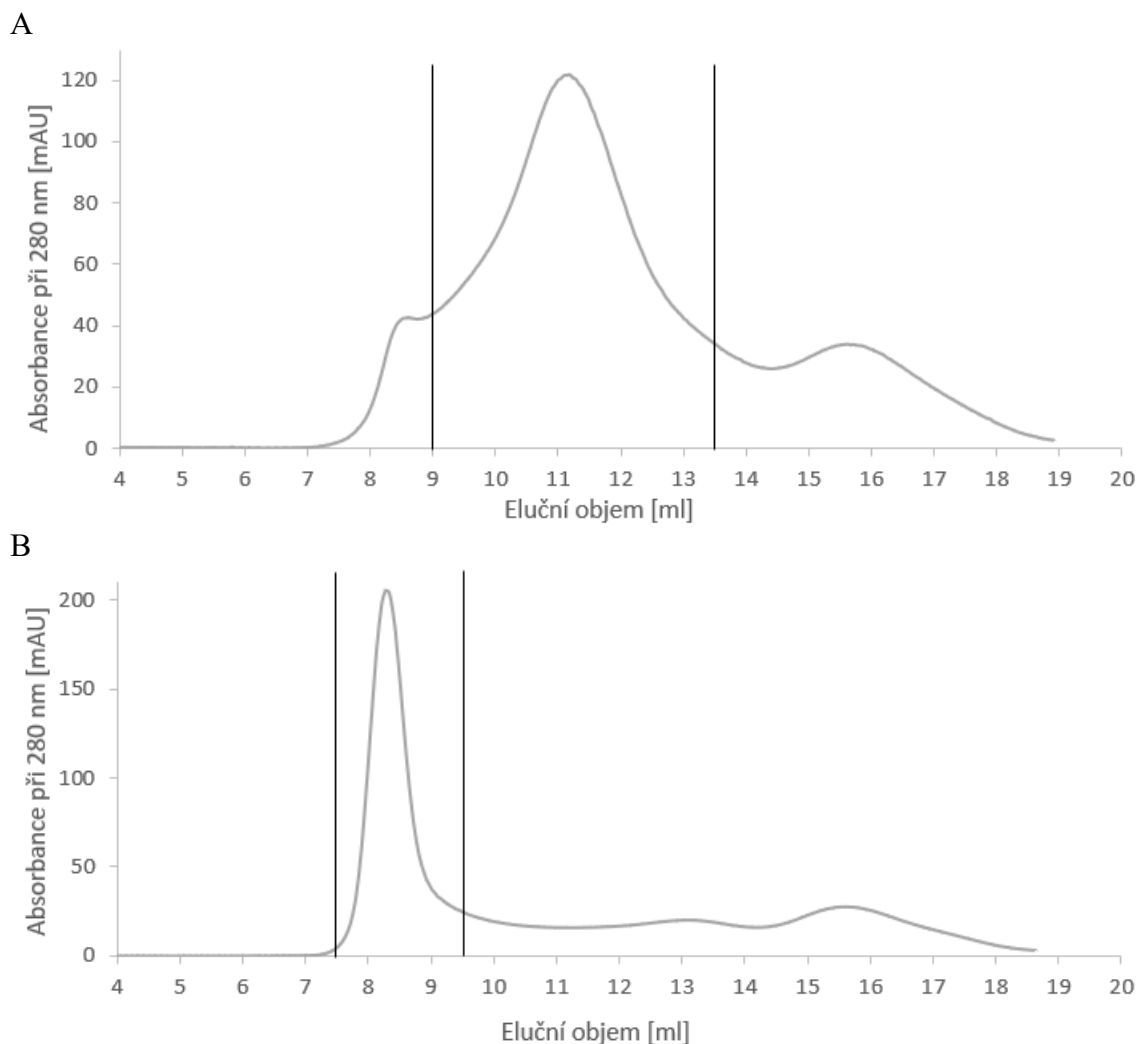
4 Výsledky

4.1 Exprese proteinů *EcDOS* a *EcDOS His77Ala*

Transformace buněk *E. coli* BL-21 (DE3) plazmidem pET28a(+)/*EcDOS*, nebo plazmidem pET28a(+)/*EcDOS His77Ala* byla provedena dle kapitoly 3.3.2. Agarové plotny s kanamycinem byly zkontrolovány vizuálně. Na plotně negativní kontroly nebyly pozorovány žádné jednobuněčné kolonie. Na ostatních plotnách byla zaznamenána přítomnost navzájem dobře rozlišitelných kolonií buněk transformovaných příslušným plazmidem. Tím byla ověřena úspěšnost transformace buněk. Exprese hemoproteinu *EcDOS* (vizte kap. 3.3.3) byla provedena během experimentální části této diplomové práce celkem sedmkrát, zatímco exprese proteinu *EcDOS His77Ala* (apoforna proteinu *EcDOS* [84]) pětkrát. Při poslední expresi proteinu *EcDOS* byla hmotnost buněk *E. coli* získaných z 1 l TB média 8,7 g a při poslední expresi proteinu *EcDOS His77Ala* byla hmotnost buněk *E. coli* BL-21 (DE3) získaných z 1 l TB média 9,7 g. V případě obou proteinů bylo obdobného výtěžku dosaženo také při ostatních expresích.

4.2 Izolace proteinů *EcDOS* a *EcDOS His77Ala*

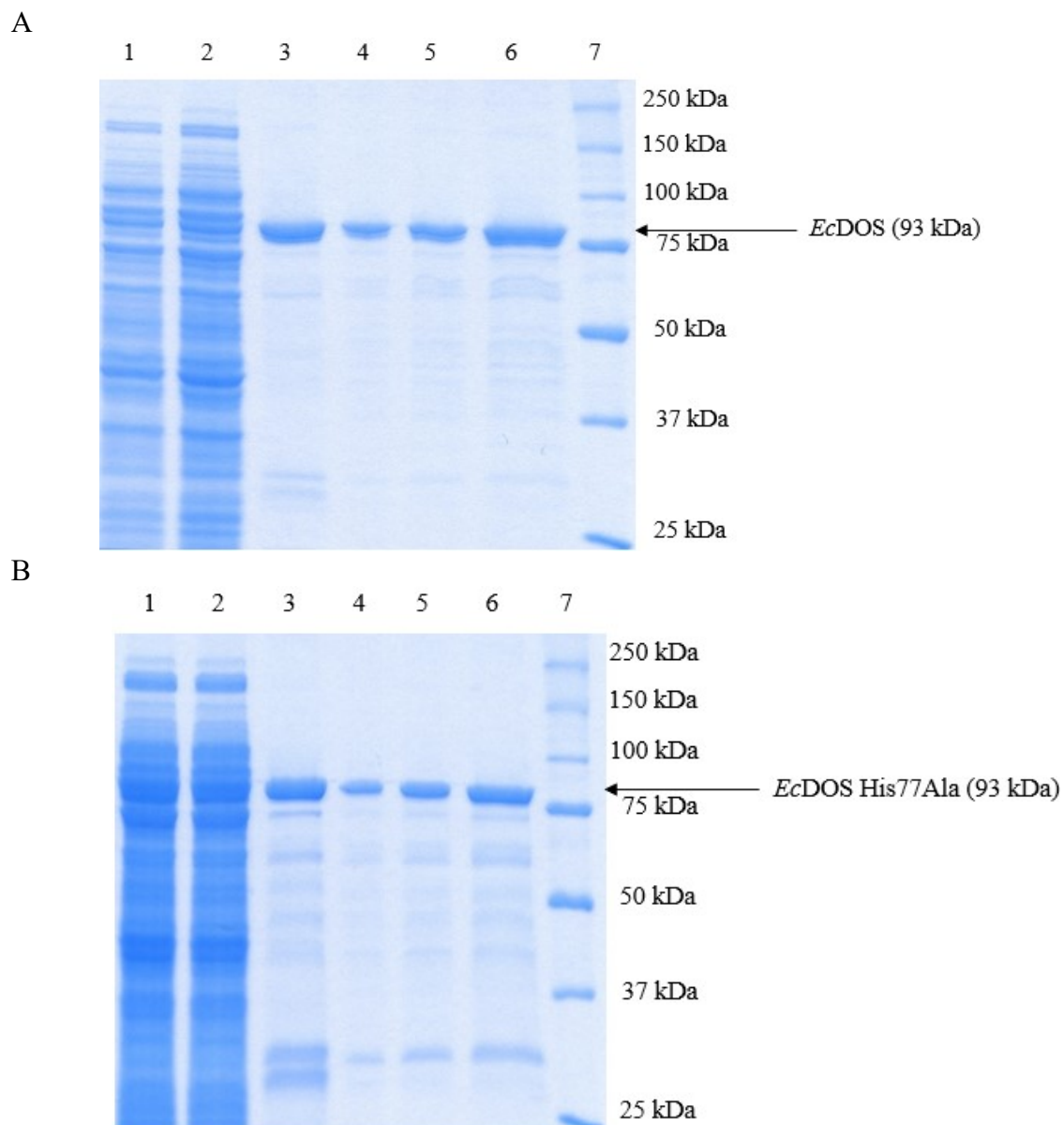
Izolace obou výše zmíněných hemoproteinů byly provedeny dle kapitoly 3.3.4. Izolace hemoproteinu *EcDOS* byla provedena celkem sedmkrát, zatímco izolace proteinu *EcDOS His77Ala* pětkrát. Vzhledem k tomu, že se výtěžky jednotlivých izolací obou proteinů výrazněji nelišily, byly jako reprezentativní vybrány poslední provedené izolace. Na chromatogramu zachycujícím průběh separace proteinu *EcDOS* (vizte šedá křivka, obr. 4.1 A, str. 50) byly pozorovány tři píky – první při elučním objemu 8,5 ml, druhý při elučním objemu 11,2 ml a třetí při elučním objemu 15,7 ml. Na chromatogramu získaném při purifikaci proteinu *EcDOS His77Ala* (vizte šedá křivka, obr. 4.1 B, str. 50) byly zaznamenány také tři píky – první při elučním objemu 8,3 ml, druhý při elučním objemu 13,2 ml a třetí při elučním objemu 15,7 ml.



Obrázek 4.1: Chromatogram zachycující průběh purifikace proteinu *EcDOS* (A) a proteinu *EcDOS His77Ala* (B) pomocí gelové permeační chromatografie. Černými čarami je vyznačen rozsah elučních objemů odebraných frakcí obsahujících protein *EcDOS*, respektive protein *EcDOS His77Ala*. Detailní podmínky stanovení jsou uvedeny v kapitole 3.3.4.

Úspěšnost izolace obou proteinů byla ověřena s využitím SDS-PAGE (postup vizte kap. 3.3.8). Záznam SDS-PAGE vzorků odebraných během poslední izolace proteinu *EcDOS* je zachycen na obr. 4.2 A (str. 51) a vzorků odebraných během poslední izolace proteinu *EcDOS His77Ala* na obr. 4.2 B (str. 51). V dráze 1 (vzorek cytosolární frakce po ultracentrifugaci) a v dráze 2 (vzorek cytosolární frakce nezachycené na afinitním nosiči) je patrný velký počet linií bakteriálních proteinů. Do dráhy 3 byl aplikován vzorek eluátu příslušného proteinu po afinitní chromatografii a do drah 4–6 byl aplikován vzorek výsledného preparátu proteinu. Nejintenzivnější linie proteinů v drahách 3–6 obou elektroforeogramů (vizte obr. 4.2 A a B) se nacházejí v oblasti molekulových hmotností 75–100 kDa (vizte linie standardů, dráha 7, obr. 4.2 A a B). Molekulová hmotnost vypočtená podle aminokyselinové sekvence proteinu *EcDOS*, respektive *EcDOS*

His77Ala (včetně histidinové kotvy) činí 93 kDa [87,97]. Tyto linie tedy pravděpodobně patří *EcDOS*, respektive *EcDOS His77Ala*. Kromě této linie lze v drahách 3–6 pozorovat také méně výrazné linie proteinů s menší molekulovou hmotností. Porovnáním drah 1 a 3 je patrné, že množství balastních proteinů v dráze 3 je mnohem nižší než v dráze 1.

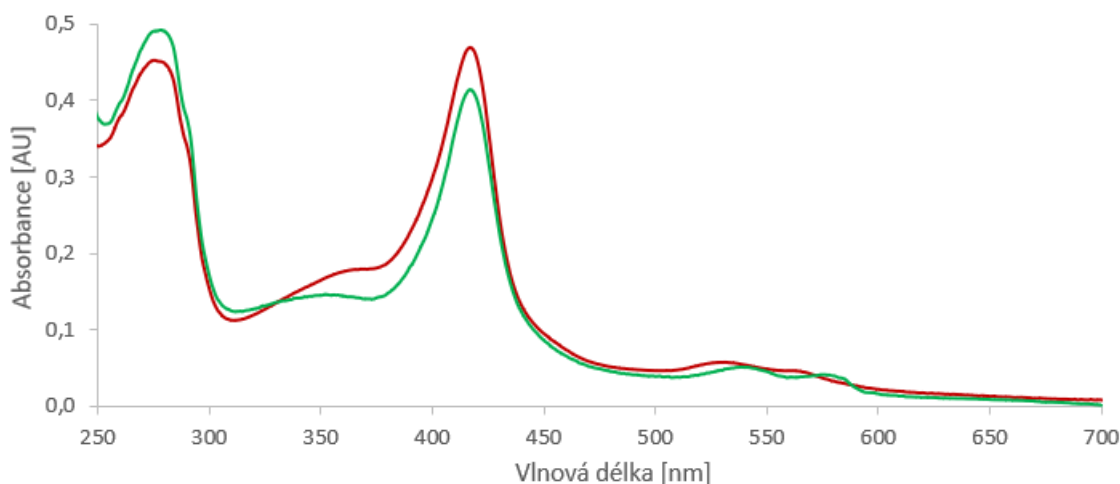


Obrázek 4.2: Záznam SDS-PAGE vzorků odebraných během izolace proteinu *EcDOS* (A) a proteinu *EcDOS His77Ala* (B). Složení finálních roztoků vzorků je uvedeno v tab. 3.1 (str. 42). Dráha 1: cytosolární frakce po ultracentrifugaci; Dráha 2: cytosolární frakce nezachycená na afinitním nosiči; Dráha 3: eluát proteinu *EcDOS*, nebo *EcDOS His77Ala* po afinitní chromatografii; Dráhy 4, 5 a 6: výsledný preparát proteinu *EcDOS*, respektive *EcDOS His77Ala* (hmotnost proteinu v jamce zaostřovacího gelu je postupně 1 μ g, 2 μ g a 4 μ g); Dráha 7: Marker Precision Plus Protein™ Unstained Standard.

Koncentrace proteinu *EcDOS*, respektive *EcDOS His77Ala* ve finálním preparátu byla určena metodou používající BCA (vizte kap. 3.3.7). Hmotnostní koncentrace proteinu *EcDOS* v roztoku o celkovém objemu 240 μl činila $4,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a molární koncentrace $43,0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. V případě *EcDOS His77Ala* byla hmotnostní koncentrace tohoto proteinu v 260 μl roztoku $3,3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a molární koncentrace $35,5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Z 1 litru TB média bylo získáno 480 μg výsledného preparátu proteinu *EcDOS*, v případě *EcDOS His77Ala* celkem 429 μg preparátu.

4.3 Spektrální analýza *EcDOS Fe(III)* a *EcDOS Fe(II)-O₂*

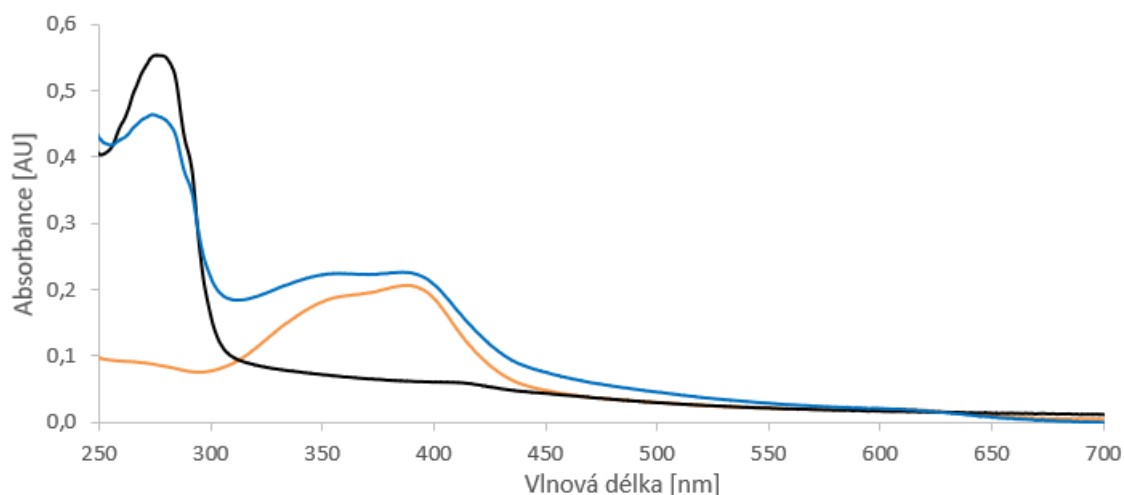
Absorpční spektra proteinů *EcDOS Fe(III)* a *EcDOS Fe(II)-O₂* byla měřena v intervalu vlnových délek od 250 do 700 nm dle kapitoly 3.3.10. Koncentrace obou forem proteinu v pufru A ($150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, pH 8,0) byla $5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Soretův pás *EcDOS Fe(III)* se vyskytoval při 417 nm a Q-pásky α a β při 531 nm a 562 nm (vizte červená křivka, obr. 4.3). Ve spektru této formy proteinu byl dále zaznamenán pík při 275 nm. Hemoprotein *EcDOS Fe(II)-O₂* byl získán podle postupu v kapitole 3.3.9. Ve spektru *EcDOS Fe(II)-O₂* byl pozorován pík při 278 nm (vizte zelená křivka, obr. 4.3). Soretův pás této formy se nacházel v oblasti 417 nm a Q-pásky α a β v oblasti 540 nm a 578 nm.



Obrázek 4.3: Absorpční spektra preparátu proteinu *EcDOS Fe(III)* (červená křivka), nebo *EcDOS Fe(II)-O₂* (zelená křivka). Koncentrace obou forem proteinu *EcDOS* v pufru A ($150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, pH 8,0) byla $5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

4.4 Spektrofotometrická analýza proteinu *EcDOS His77Ala*

Měření níže uvedených UV-VIS spekter (v intervalu vlnových délek 250 až 700 nm) a příprava příslušných vzorků byly provedeny dle kapitoly 3.3.10. Absorpční maximum spektra proteinu *EcDOS His77Ala* (apofорма proteinu *EcDOS* [84]) o koncentraci $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v pufru A ($150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, pH 8,0) bylo nalezeno při 276 nm (vizte černá křivka, obr. 4.4). Dále bylo měřeno spektrum $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku heminu v pufru A ($150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, pH 8,0). Absorpční maximum tohoto spektra se vyskytovalo v oblasti 387 nm (vizte oranžová křivka, obr. 4.4). V absorpčním spektru roztoku proteinu *EcDOS His77Ala* (finální koncentrace $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) s heminem (finální koncentrace $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v pufru A) byly pozorovány dva píky (vizte modrá křivka, obr. 4.4) – při 274 nm a v oblasti okolo 390 nm.



Obrázek 4.4: Absorpční spektrum preparátu proteinu *EcDOS His77Ala* (černá křivka), spektrum roztoku heminu (oranžová křivka) a spektrum roztoku proteinu *EcDOS His77Ala* s heminem (modrá křivka). Finální koncentrace *EcDOS His77Ala* v pufru A ($150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, pH 8,0) byla $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Koncentrace heminu v pufru A byla $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. K roztoku proteinu *EcDOS His77Ala* v pufru A o koncentraci $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ byl přidán hemin ve výsledné koncentraci $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

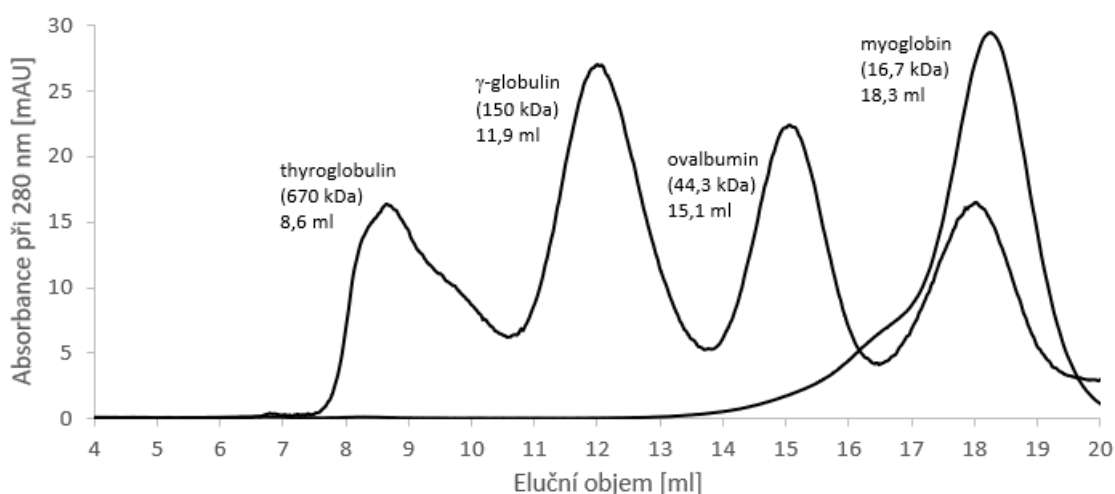
4.5 Studium oligomerních stavů proteinů *EcDOS Fe(III)*, *EcDOS His77Ala* a *EcDOS Fe(II)-O₂* pomocí gelové permeační chromatografie

Kalibrace kolony Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) byla provedena dle kapitoly 3.3.11. Na chromatogramu separace standardních proteinů využitých pro kalibraci této kolony (vizte obr. 4.5, str. 54) byl pozorován pík odpovídající thyroglobinu (670 kDa)

při elučním objemu 8,6 ml, γ -globulinu (150 kDa) při elučním objemu 11,9 ml, ovalbuminu (44,3 kDa) při elučním objemu 15,1 ml a myoglobinu (16,7 kDa) při elučním objemu 18,3 ml. Kalibrační závislost použité kolony byla vyjádřena jako závislost logaritmu molekulové hmotnosti standardních proteinů na jejich elučním objemu. Rovnice této závislosti je následující:

$$y = -0,1654 \cdot x + 4,1968, \quad (4.1)$$

kde y označuje dekadický logaritmus molekulové hmotnosti proteinu (udané v kDa) a x představuje eluční objem tohoto proteinu (ml).



Obrázek 4.5: Kalibrace chromatografické kolony Superdex 200 10/300 GL. Eluční profil standardních proteinů (thyroglobulinu, γ -globulinu, ovalbuminu a myoglobinu) sledovaný při vlnové délce 280 nm během gelové permeační chromatografie. V grafu jsou uvedeny molekulové hmotnosti a eluční objemy jednotlivých standardů. Detailní podmínky stanovení jsou uvedeny v kapitole 3.3.11.

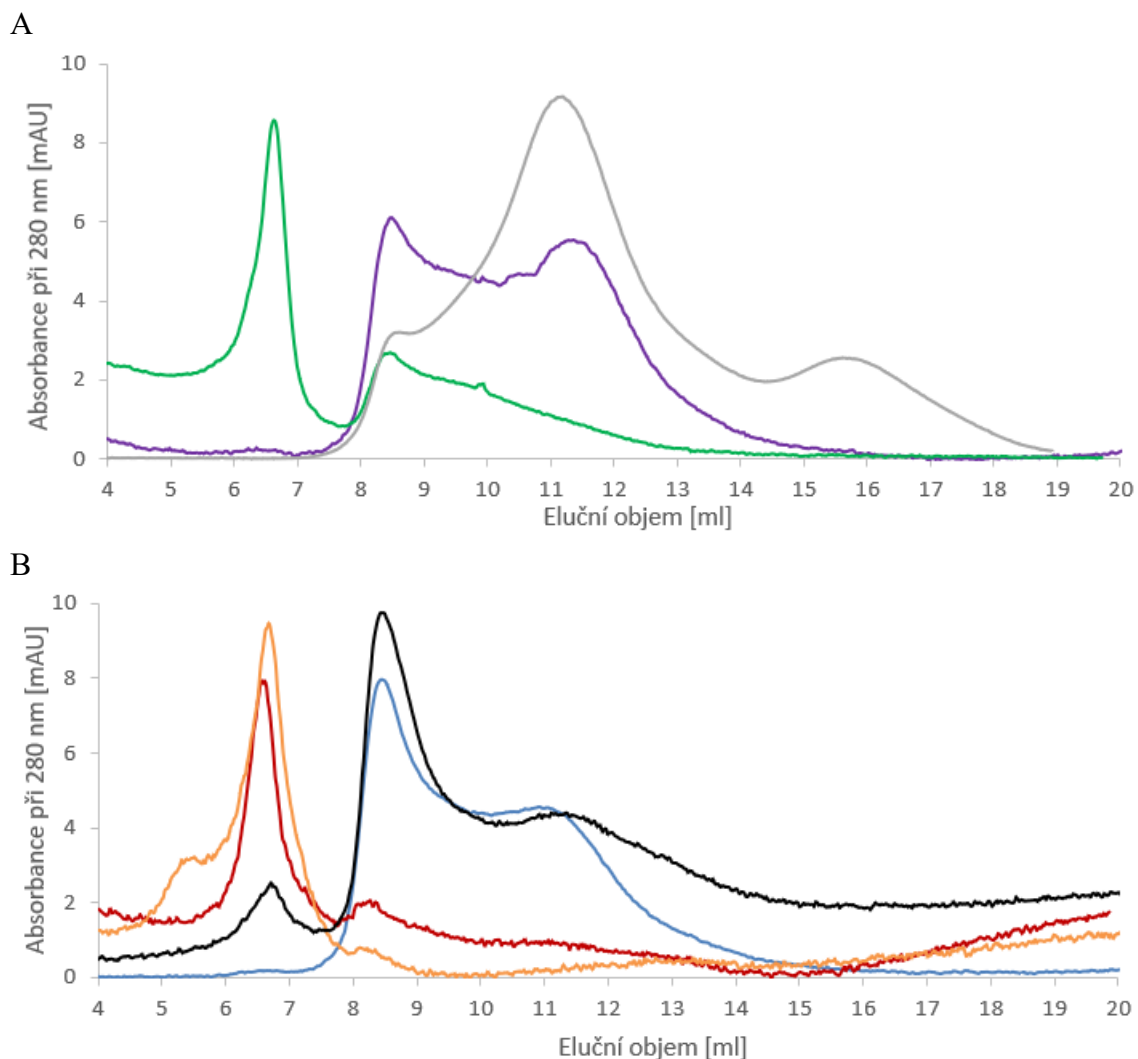
4.5.1 Analýza oligomerních stavů proteinu *EcDOS Fe(III)*

Jak již bylo zmíněno výše, pro finální purifikaci preparátu proteinu *EcDOS Fe(III)* byla využita gelová permeační chromatografie. Na získaném chromatogramu (vizte šedá křivka, obr. 4.6 A, str. 56 a také obr. 4.1 A, str. 50) bylo pozorováno majoritní zastoupení formy eluované při objemu 11,2 ml, která odpovídala střednímu oligomernímu stavu separovanému chromatografickou kolonou (vizte tab. 4.1, str. 57).

Před samotným studiem oligomerních stavů *EcDOS Fe(III)* byl preparát proteinu, který byl po izolaci skladován při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (vizte kap. 3.3.4), temperován na laboratorní teplotu ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$). V kapitole 3.3.11.2 jsou uvedeny dvě různé metody temperování. Po inkubaci vzorku proteinu při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 2 hodin a ihned poté při teplotě $20\text{ }^{\circ}\text{C}$

po dobu 0,5 hodiny byly na chromatogramu (vizte zelená křivka, obr. 4.6 A, str. 56 a tab. 4.1, str. 57) zaznamenány dva píky – první při objemu 6,6 ml (mrtvý objem kolony) a druhý při objemu 8,3 ml (odpovídající nejvyššímu oligomernímu stavu separovanému kolonou). Po inkubaci při teplotě 0 °C po dobu 4 hodin a ihned poté při teplotě 20 °C po dobu 3 hodin se *EcDOS* Fe(III) (vizte fialová křivka, obr. 4.6 A a tab. 4.1) vyskytoval v roztoku ve dvou stavech – v nejvyšším oligomerním stavu (eluční objem 8,5 ml) a ve středním oligomerním stavu (eluční objem 11,3 ml) separovaném kolonou.

Dalším krokem bylo studium vlivu délky inkubace při teplotě 0 °C na stabilitu vzorku *EcDOS* Fe(III) (vizte kap. 3.3.11.2). Po určitém časovém intervalu inkubace při teplotě 0 °C (vizte níže) byl vzorek hemoproteinu okamžitě využit pro analýzu při laboratorní teplotě (20 °C). Na elučních profilech proteinu *EcDOS* Fe(III), který byl inkubován při teplotě 0 °C po dobu 0,5 hodiny (vizte červená křivka, obr. 4.6 B, str. 56 a tab. 4.1, str. 57), respektive byl inkubován při teplotě 0 °C po dobu 1 hodiny (vizte oranžová křivka, obr. 4.6 B a tab. 4.1), bylo pozorováno majoritní zastoupení formy eluované při mrtvém objemu kolony. Po inkubaci preparátu *EcDOS* Fe(III) po dobu 1,5 hodiny při teplotě 0 °C bylo na chromatogramu (vizte černá křivka, obr. 4.6 B a tab. 4.1) zaznamenáno mnohem nižší zastoupení formy eluované při mrtvém objemu kolony (6,8 ml) než v předchozích dvou případech a také byly pozorovány další dvě formy proteinu eluované při 8,5 ml a 11,4 ml, které odpovídaly nejvyššímu a střednímu oligomernímu stavu separovanému kolonou. Vzorek *EcDOS* Fe(III) inkubovaný při teplotě 0 °C po dobu 3 hodin se v roztoku vyskytoval pouze ve dvou formách (vizte modrá křivka, obr. 4.6 B a tab. 4.1) – v nejvyšším oligomerním stavu (eluční objem 8,5 ml) a ve středním oligomerním stavu (eluční objem 11,2 ml) separovaném kolonou.



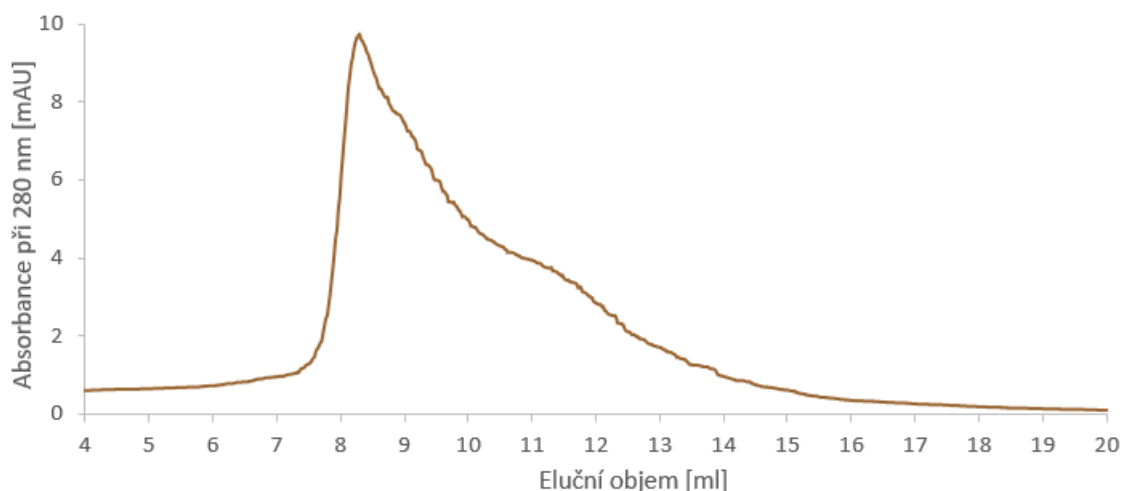
Obrázek 4.6: Eluční profil proteinu *EcDOS Fe(III)* sledovaný při vlnové délce 280 nm během gelové permeační chromatografie. (A) Eluční profil získaný při purifikaci tohoto proteinu (vizte také obr. 4.1 A, str. 50) je znázorněn šedou křivkou a hodnoty absorbance při 280 nm byly vynásobeny koeficientem 0,075. Temperování finálního preparátu *EcDOS Fe(III)* na laboratorní teplotu (20 °C) bylo následující – inkubace preparátu při –20 °C po dobu 2 hodin a poté při 20 °C po dobu 0,5 hodiny (zelená křivka), nebo inkubace preparátu při 0 °C po dobu 4 hodin a poté při 20 °C po dobu 3 hodin (fialová křivka). (B) Studium vlivu různé délky inkubace při teplotě 0 °C na stabilitu proteinu *EcDOS Fe(III)* – po dobu 0,5 hodiny (červená křivka), po dobu 1 hodiny (oranžová křivka), po dobu 1,5 hodiny (černá křivka) a po dobu 3 hodin (modrá křivka). Detailní podmínky stanovení jsou uvedeny v kapitole 3.3.11.

Tabulka 4.1: Srovnání elučních objemů, experimentem zjištěných molekulových hmotností proteinu *EcDOS Fe(III)* a poměrů experimentem zjištěné molekulové hmotnosti a teorií vypočtené molekulové hmotnosti. Experimentem zjištěná molekulová hmotnost byla stanovena na základě rovnice kalibrační závislosti kolony Superdex 200 10/300 GL (vizte obr. 4.5, str. 54 a vztah 4.1). Pro stanovení poměru byla využita molekulová hmotnost proteinu *EcDOS* (včetně histidinové kotvy) určená podle aminokyselinové sekvence (93 kDa [87,97]). Detailní podmínky stanovení jsou uvedeny v kapitole 3.3.11.

Vzorek	Experimentální podmínky přípravy preparátu proteinu pro analýzu	Eluční objem [ml]	Experimentem zjištěná molekulová hmotnost proteinu [kDa]	Poměr experimentem zjištěné molekulové hmotnosti a teorií vypočtené molekulové hmotnosti
<i>EcDOS Fe(III)</i>	purifikace	11,2	221	2
	-20 °C (2 h) a 20 °C (0,5 h)	6,6	1274	14
		8,3	667	7
	0 °C (4 h) a 20 °C (3 h)	8,5	618	7
		11,3	213	2
	0 °C (0,5 h)	6,6	1274	14
		8,3	667	7
	0 °C (1 h)	6,7	1226	13
		8,3	667	7
	0 °C (1,5 h)	6,8	1181	13
		8,5	618	7
		11,4	205	2
	0 °C (3 h)	8,5	618	7
		11,2	221	2

4.5.2 Analýza oligomerních stavů proteinu *EcDOS Fe(II)-O₂*

Pro analýzu gelovou permeační chromatografií, která probíhala při laboratorní teplotě (20 °C), byl protein *EcDOS Fe(II)-O₂* připraven postupem uvedeným v kapitole 3.3.9. Na chromatogramu zachycujícím separaci *EcDOS Fe(II)-O₂* (vizte hnědá křivka, obr. 4.7, str. 58) byly pozorovány dva píky (vizte tab. 4.2, str. 58) – při elučním objemu 8,3 ml (majoritně zastoupená forma) a při objemu 11,2 ml (minoritně zastoupená forma). První zmíněná forma byla v roztoku v nejvyšším oligomerním stavu, zatímco druhá zmíněná forma se v roztoku vyskytovala ve středním oligomerním stavu separovaném kolonou.



Obrázek 4.7: Eluční profil proteinu *EcDOS Fe(II)-O₂* sledovaný při vlnové délce 280 nm během gelové permeační chromatografie. Detailní podmínky stanovení jsou uvedeny v kapitole 3.3.11. Tato forma proteinu byla získána postupem uvedeným v kapitole 3.3.9.

Tabulka 4.2: Srovnání elučních objemů, experimentem zjištěných molekulových hmotností proteinu *EcDOS Fe(II)-O₂* a experimentem zjištěné molekulové hmotnosti a teorií vypočtené molekulové hmotnosti. Experimentem zjištěná molekulová hmotnost byla stanovena na základě rovnice kalibrační závislosti kolony Superdex 200 10/300 GL (vizte obr. 4.5, str. 54 a vztah 4.1). Pro stanovení poměru byla využita molekulová hmotnost proteinu *EcDOS* (včetně histidinové kotvy) určená podle aminokyselinové sekvence (93 kDa [87,97]). Detailní podmínky stanovení jsou uvedeny v kapitole 3.3.11.

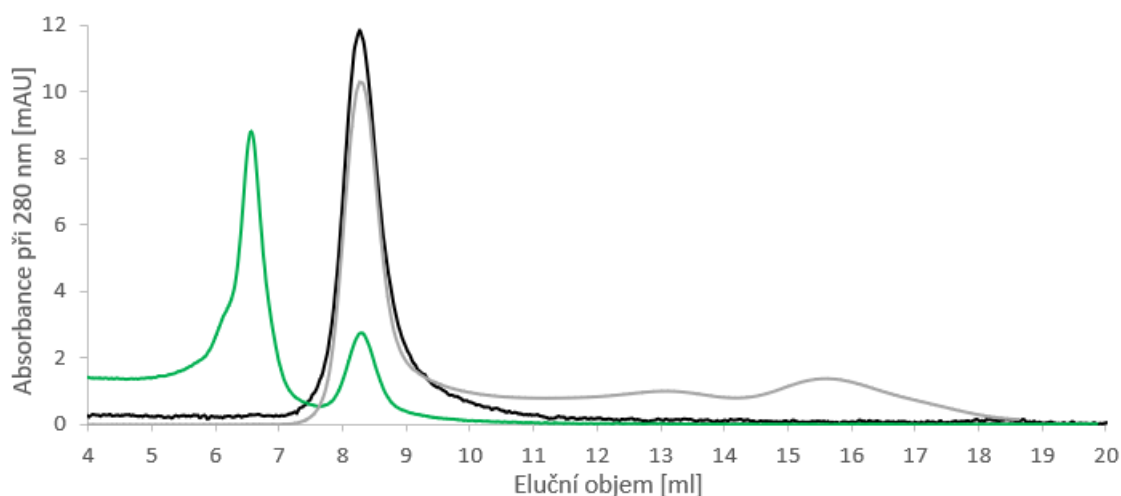
Vzorek	Experimentální podmínky přípravy preparátu proteinu pro analýzu	Eluční objem [ml]	Experimentem zjištěná molekulová hmotnost proteinu [kDa]	Poměr experimentem zjištěné molekulové hmotnosti a teorií vypočtené molekulové hmotnosti
<i>EcDOS Fe(II)-O₂</i>	vizte kap. 3.3.9	8,3	667	7
		11,2	221	2

4.5.3 Analýza oligomerních stavů proteinu *EcDOS His77A1a*

Na chromatogramu získaném při purifikaci proteinu *EcDOS His77A1a* gelovou permeační chromatografií (vizte šedá křivka, obr. 4.8, str. 59 a také vizte obr. 4.1 B, str. 50) byla pozorována většinou zastoupená forma eluovaná při objemu 8,3 ml (vizte tab. 4.3, str. 60). *EcDOS His77A1a* se v tomto případě v roztoku vyskytoval v nejvyšším oligomerním stavu separovaném kolonou.

Studium oligomerních stavů proteinu *EcDOS His77A1a* probíhalo při laboratorní teplotě (20 °C). Jelikož preparát proteinu *EcDOS His77A1a* byl po izolaci skladován při -80 °C (vizte kap. 3.3.4), byl tento preparát pro analýzu temperován dvěma různými metodami (vizte kap. 3.3.11.2). Po inkubaci vzorku tohoto proteinu při teplotě -20 °C po

dobu 2 hodin s bezprostředně následující inkubací při 20 °C po dobu 0,5 hodiny byly na chromatogramu (vizte zelená křivka, obr. 4.8) zaznamenány dva píky – majoritní při elučním objemu 6,6 ml a minoritní při 8,3 ml (vizte tab. 4.3, str. 60). Objem 6,6 ml odpovídal mrtvému objemu kolony. Forma proteinu eluovaná při 8,3 ml byla v roztoku přítomna v nejvyšším oligomerním stavu, který byl separován kolonou. Po inkubaci vzorku *EcDOS His77Ala* při teplotě 0 °C po dobu 1,5 hodiny a jeho bezprostřední analýze při 20 °C byla na elučním profilu (vizte černá křivka, obr. 4.8) pozorována přítomnost jediného píku při elučním objemu 8,3 ml (vizte tab. 4.3), který odpovídal proteinu vyskytujícímu se v roztoku v nejvyšším oligomerním stavu rozděleném kolonou.



Obrázek 4.8: Eluční profil proteinu *EcDOS His77Ala* sledovaný při vlnové délce 280 nm během gelové permeační chromatografie. Eluční profil získaný při purifikaci tohoto proteinu (vizte také obr. 4.1 B, str. 50) je znázorněn šedou křivkou a hodnoty absorbance při 280 nm byly vynásobeny koeficientem 0,05. Temperování finálního preparátu *EcDOS His77Ala* pro analýzu bylo následující – inkubace při –20 °C po dobu 2 hodin a při 20 °C po dobu 0,5 hodiny (zelená křivka), nebo inkubace při 0 °C po dobu 1,5 hodiny (černá křivka). Detailní podmínky stanovení jsou uvedeny v kapitole 3.3.11.

Tabulka 4.3: Srovnání elučních objemů, experimentem zjištěných molekulových hmotností proteinu *EcDOS His77Ala* a poměrů experimentem zjištěné molekulové hmotnosti a teorií vypočtené molekulové hmotnosti. Experimentem zjištěná molekulová hmotnost byla stanovena na základě rovnice kalibrační závislosti kolony Superdex 200 10/300 GL (vizte obr. 4.5, str. 54 a vztah 4.1). Pro stanovení poměru byla využita molekulová hmotnost proteinu *EcDOS His77Ala* (včetně histidinové kotvy) určená podle aminokyselinové sekvence (93 kDa [87,97]). Detailní podmínky stanovení jsou uvedeny v kapitole 3.3.11.

Vzorek	Experimentální podmínky přípravy preparátu proteinu pro analýzu	Eluční objem [ml]	Experimentem zjištěná molekulová hmotnost proteinu [kDa]	Poměr experimentem zjištěné molekulové hmotnosti a teorií vypočtené molekulové hmotnosti
<i>EcDOS His77Ala</i>	purifikace	8,3	667	7
	-20 °C (2 h) a 20 °C (0,5 h)	6,6	1274	14
		8,3	667	7
	0 °C (1,5 h)	8,3	667	7

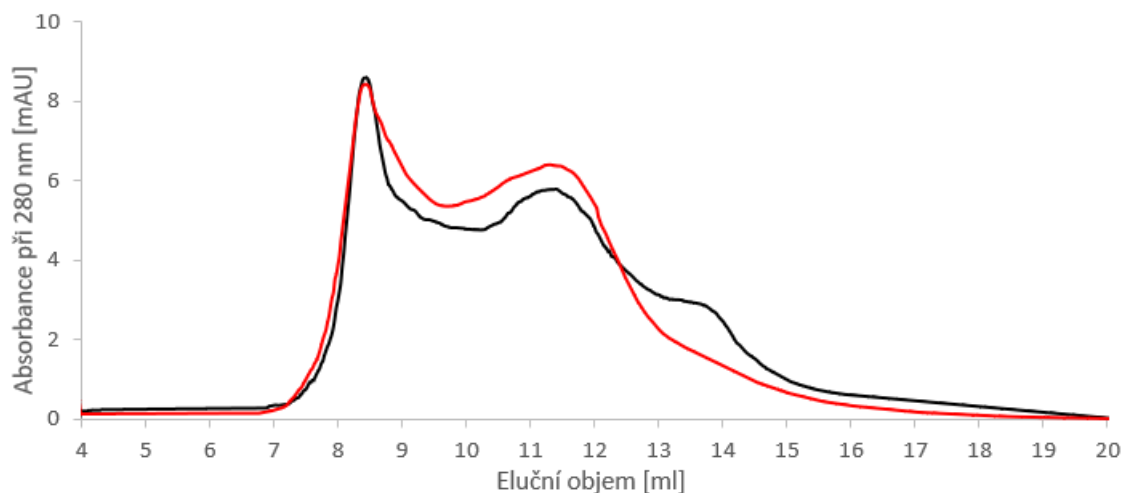
4.5.4 Vliv substrátu c-di-GMP na oligomerní stavy proteinů *EcDOS Fe(III)*, *EcDOS Fe(II)-O₂* a *EcDOS His77Ala*

Proteiny *EcDOS Fe(III)*, *EcDOS Fe(II)-O₂* nebo *EcDOS His77Ala* byly analyzovány nejprve v nepřítomnosti a poté v přítomnosti substrátu c-di-GMP (vizte kap. 3.3.11). Preparáty proteinů *EcDOS Fe(III)* a *EcDOS His77Ala*, které byly po izolaci skladovány při -80 °C (vizte kap. 3.3.4), byly inkubovány při teplotě 0 °C po dobu 1,5 hodiny a následně využity pro analýzu při laboratorní teplotě (20 °C). *EcDOS Fe(II)-O₂* byl získán postupem uvedeným v kapitole 3.3.9. Výsledná koncentrace dané formy proteinu v roztoku při aplikaci na kolonu byla 8 μmol·l⁻¹. Koncentrace c-di-GMP v tomto roztoku činila 8 μmol·l⁻¹. Koncentrační poměr proteinu ku c-di-GMP byl tedy 1 : 1. Tento experiment byl proveden dvakrát s vysokou reprodukovatelností (pro jeden z experimentů data nejsou ukázána).

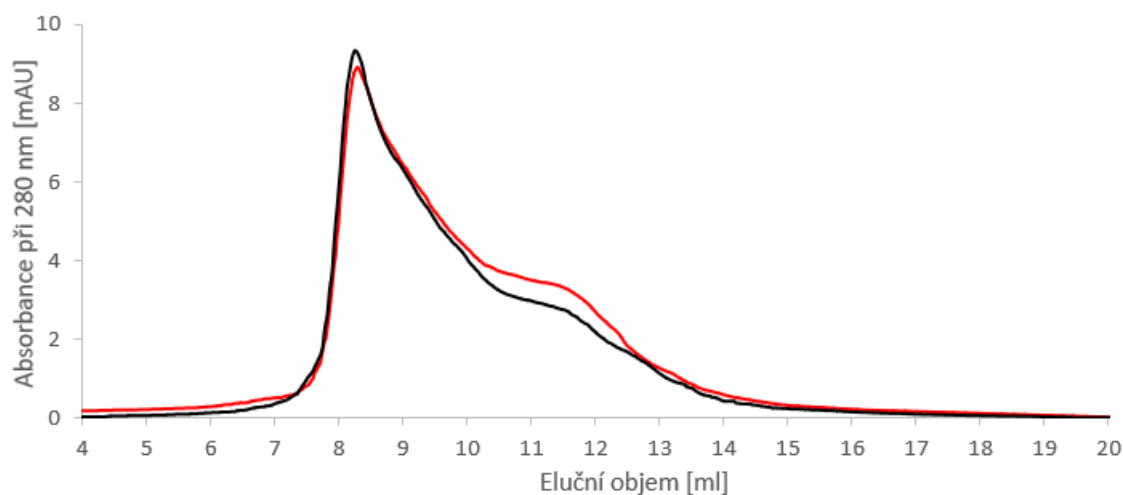
Na elučním profilu proteinu *EcDOS Fe(III)* bylo vlivem přidavku c-di-GMP zaznamenáno snížené zastoupení formy proteinu eluované při 11,4 ml a nově eluovaná forma při 13,7 ml (vizte obr. 4.9, str. 61 a tab. 4.4, str. 62). První zmíněná forma odpovídala střednímu oligomernímu stavu, zatímco druhá zmíněná forma odpovídala nejnižšímu oligomernímu stavu, který byl separován kolonou. Forma eluovaná při 8,5 ml, která odpovídala nejvyššímu oligomernímu stavu separovanému kolonou, v roztoku převažovala a vlivem přidavku c-di-GMP nebyla pozorována změna v jejím zastoupení (vizte obr. 4.9 a tab. 4.4).

Na elučním profilu proteinu *EcDOS* Fe(II)-O₂ byly pozorovány dvě formy – majoritní eluovaná při 8,3 ml a minoritní eluovaná při 11,4, nebo 11,5 ml (vizte obr. 4.10 a tab. 4.4, str. 62). Vlivem přítomnosti c-di-GMP bylo v roztoku sníženo zastoupení minoritní formy (odpovídající střednímu oligomernímu stavu) a zastoupení majoritní formy (odpovídající nejvyššímu oligomernímu stavu) se lehce zvýšilo.

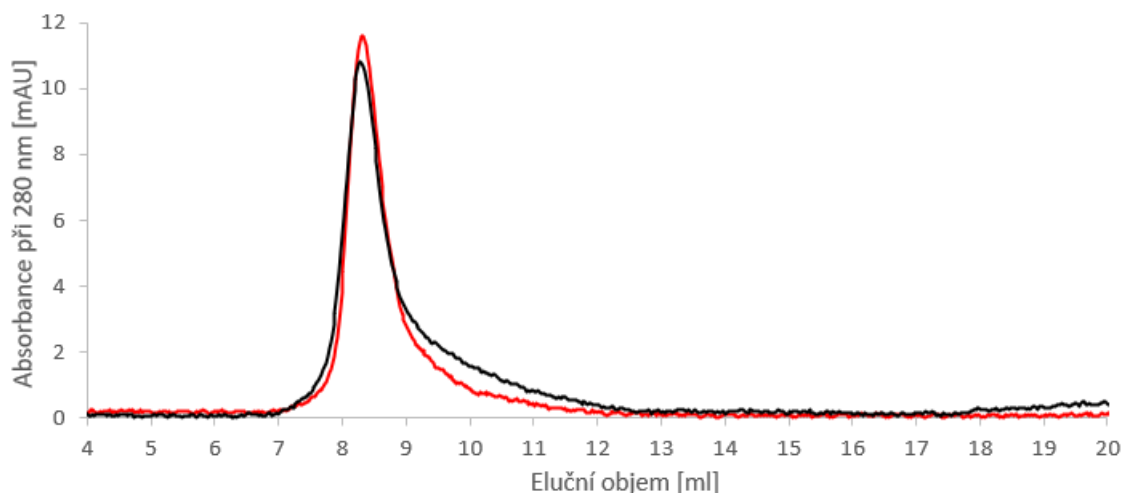
Protein *EcDOS* His77Ala se v roztoku vyskytoval bez ohledu na přítomnost c-di-GMP v jediné formě, která byla eluována při 8,3 ml (vizte obr. 4.11, str. 62 a tab. 4.4, str. 62). Tato forma odpovídala nejvyššímu oligomernímu stavu separovanému kolonou.



Obrázek 4.9: Eluční profil proteinu *EcDOS* Fe(III) v nepřítomnosti substrátu c-di-GMP (červená křivka) a v přítomnosti c-di-GMP (černá křivka) sledovaný při vlnové délce 280 nm během gelové permeační chromatografie. Detailní podmínky stanovení jsou uvedeny v kapitole 3.3.11.



Obrázek 4.10: Eluční profil proteinu *EcDOS* Fe(II)-O₂ v nepřítomnosti substrátu c-di-GMP (červená křivka) a v přítomnosti c-di-GMP (černá křivka) sledovaný při vlnové délce 280 nm během gelové permeační chromatografie. Detailní podmínky stanovení jsou uvedeny v kapitole 3.3.11.



Obrázek 4.11: Eluční profil proteinu *EcDOS His77Ala* v nepřítomnosti substrátu c-di-GMP (červená křivka) a v přítomnosti c-di-GMP (černá křivka) sledovaný při vlnové délce 280 nm během gelové permeační chromatografie. Detailní podmínky stanovení jsou uvedeny v kapitole 3.3.11.

Tabulka 4.4: Srovnání elučních objemů, experimentem zjištěných molekulových hmotností proteinů a poměrů experimentem zjištěné molekulové hmotnosti a teorií vypočtené molekulové hmotnosti. Experimentem zjištěná molekulová hmotnost byla stanovena na základě rovnice kalibrační závislosti kolony Superdex 200 10/300 GL (vizte obr. 4.5, str. 54 a vztah 4.1). Pro stanovení poměru byla využita molekulová hmotnost proteinu *EcDOS*, nebo proteinu *EcDOS His77Ala* (včetně histidinové kotvy) určená podle aminokyselinové sekvence (93 kDa [87,97]). Detailní podmínky stanovení jsou uvedeny v kapitole 3.3.11.

Vzorek	Přítomnost substrátu c-di-GMP	Eluční objem [ml]	Experimentem zjištěná molekulová hmotnost proteinu [kDa]	Poměr experimentem zjištěné molekulové hmotnosti a teorií vypočtené molekulové hmotnosti
<i>EcDOS Fe(III)</i>	ne	8,5	618	7
		11,4	205	2
	ano	8,5	618	7
		11,4	618	7
		13,7	86	1
<i>EcDOS Fe(II)-O₂</i>	ne	8,3	667	7
		11,4	205	2
	ano	8,3	667	7
		11,5	197	2
<i>EcDOS His77Ala</i>	ne	8,3	667	7
	ano	8,3	667	7

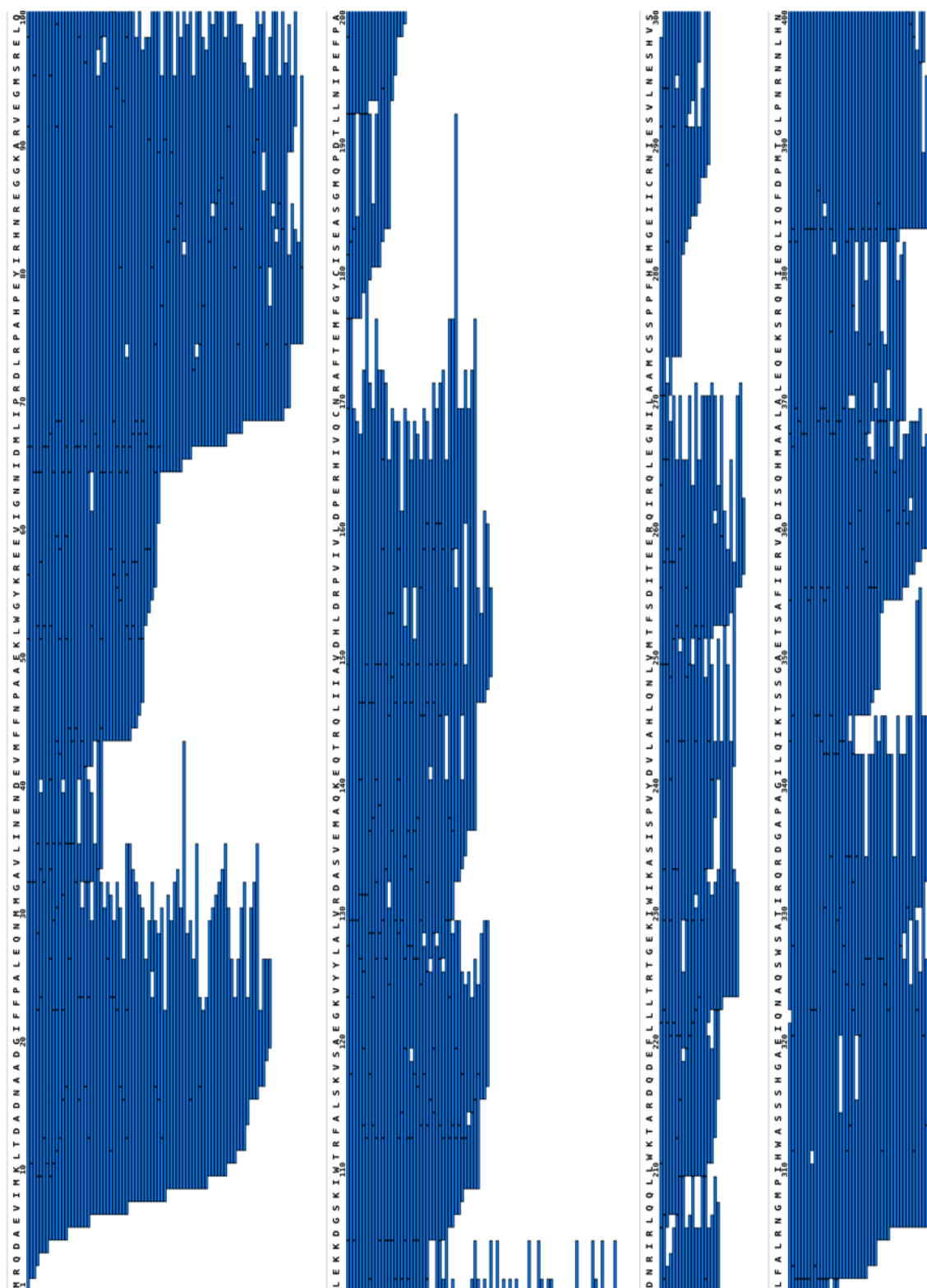
4.6 Analýza strukturní dynamiky proteinů *EcDOS* Fe(III), *EcDOS* Fe(II)-O₂ a *EcDOS* His77Ala

Strukturní dynamika proteinu *EcDOS* ve formě Fe(III) a ve formě Fe(II)-O₂ a proteinu *EcDOS* His77Ala byla studována pomocí HDX-MS (vizte kap. 3.3.12).

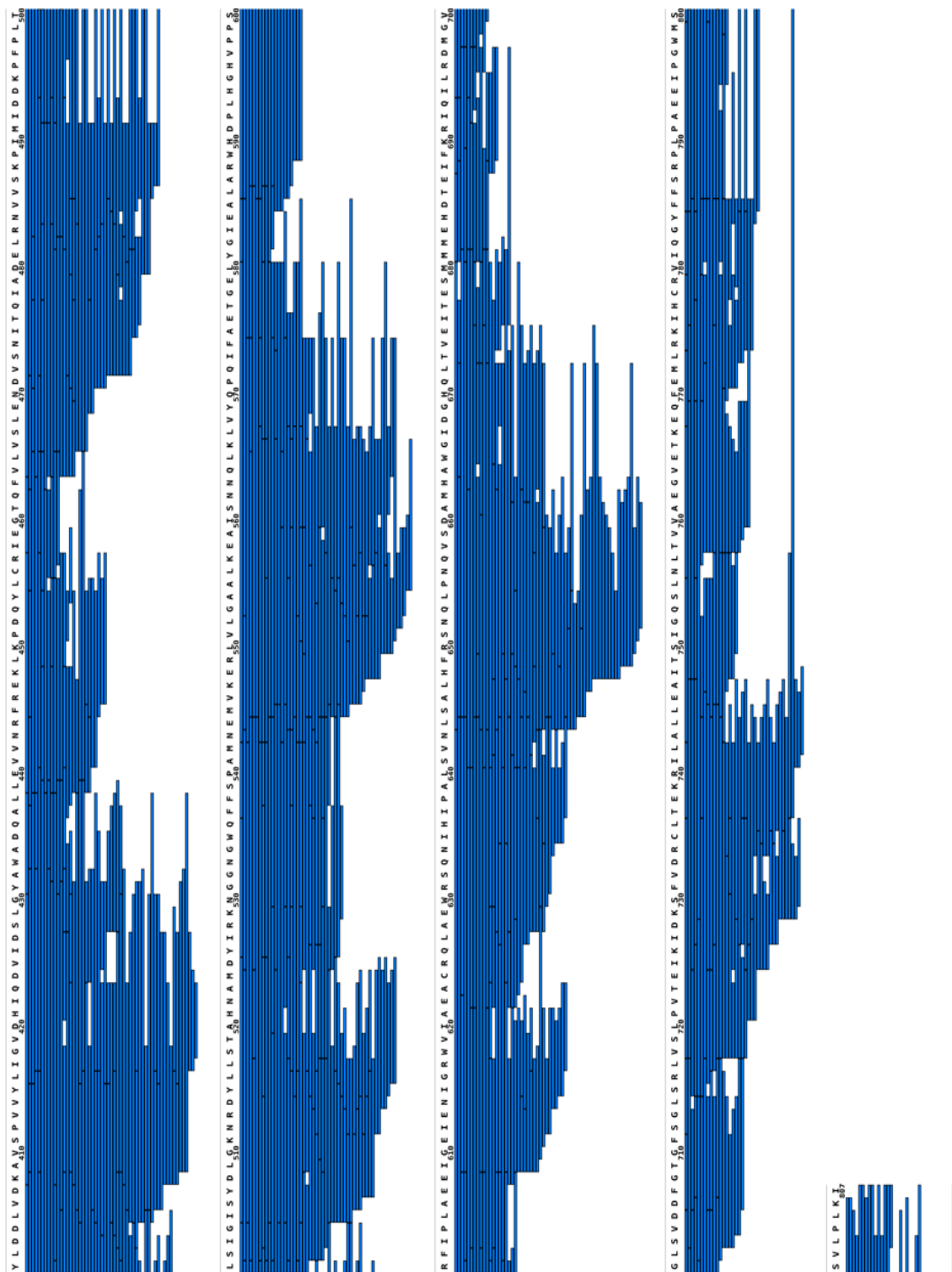
4.6.1 Peptidové mapování

Vlastnímu měření HDX-MS předcházela proces peptidového mapování, jehož cílem bylo nalézt podmínky štěpení poskytující dostatečné množství redundantních peptidů pokrývajících sekvenci proteinu *EcDOS*. Mapování, při kterém byly vyzkoušeny různé typy aspartátových proteas, bylo realizováno v módu LC-MS/MS. Jako nejvýhodnější kombinace proteas se ukázalo využití proteasové kolony s maticí obsahující koimobilizovaný pepsin a nepenthesin-2. Tímto způsobem bylo dosaženo 100% pokrytí sekvence *EcDOS* peptidy (vizte obr. 4.12 A, str. 64 a 4.12 B, str. 65).

V následujících kapitolách jsou popsány výsledky HDX-MS analýzy *EcDOS* Fe(III), *EcDOS* Fe(II)-O₂ a *EcDOS* His77Ala, během níž bylo dosaženo 95,9% pokrytí sekvence *EcDOS*, respektive *EcDOS* His77Ala (data nejsou ukázána). Části těchto proteinů, které nebyly charakterizovány žádnými peptidy, zahrnují aminokyseliny 1–9 a 271–294.



Obrázek 4.12 A: První část aminokyselinové sekvence proteinu *EcDOS* s vyznačenými peptidy (modré obdélníky) detekovanými během peptidového mapování. S využitím proteasové kolony s koimobilizovaným pepsinem a nepenthesinem-2 bylo zajištěno 100% pokrytí aminokyselinové sekvence proteinu. Postup mapování je uveden v kapitole 3.3.12.



Obrázek 4.12 B: Druhá část aminokyselinové sekvence proteinu *EcDOS* s vyznačenými peptidy (modré obdélníky) detekovanými během peptidového mapování. S využitím proteasové kolony s koimobilizovaným pepsinem a nepenthesinem-2 bylo zajištěno 100% pokrytí aminokyselinové sekvence proteinu. Postup mapování je uveden v kapitole 3.3.12.

4.6.2 Deuterační profil proteinu *EcDOS Fe(III)*

Deuterační profil *EcDOS Fe(III)*, který je vyobrazen na obr. 4.13 (str. 68), byl vyjádřen jako závislost úrovně deuterace na aminokyselinové sekvenci *EcDOS*. V horní části obrázku je schematicky naznačena sekundární struktura těch domén proteinu, jejichž struktura již byla vyřešena na základě rentgenostrukturní analýzy izolovaných samostatných domén [85,90]. Úroveň deuterace proteinu *EcDOS Fe(III)* po dvou hodinách (nejdelší měřený časový interval) dosahovala maximálně k téměř 63 % potenciálně vyměnitelných atomů vodíku za deuterium. Deuterační profil tohoto proteinu je níže popsán po jednotlivých částech *EcDOS* (PAS-A doména, PAS-B doména, oblast mezi PAS-B a GGDEF doménami, GGDEF doména a EAL doména [83]).

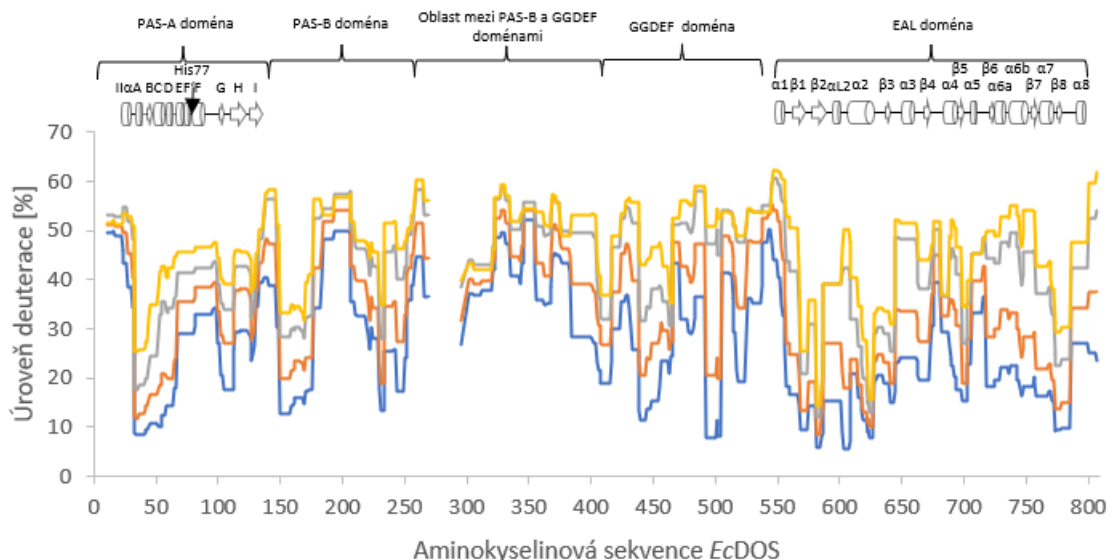
Po 20 sekundách výměnné reakce byly nejméně deuterovanými částmi (deuterace méně než 20 %) PAS-A domény (aminokyseliny 1–139 [85]) regiony zahrnující aminokyseliny 33–66 a 102–112. S rostoucí délkou inkubace zde byl pozorován postupný nárůst úrovně deuterace. Oblasti, které byly po 20 sekundách více deuterované (úroveň deuterace více než 20 %) a jejichž deuterace se v čase také postupně zvyšovala, obsahovaly aminokyseliny 67–101 a 113–129. N-terminální část *EcDOS Fe(III)* (aminokyseliny 10–23) vykazovala vysokou úroveň deuterace (přibližně 50 %) beze změny v čase. Mírně nižší úroveň deuterace (o 10–15 %) ve srovnání s N-terminální částí po 20 sekundách měly sekvence 24–32 a 130–149 (zahrnující koncovou část PAS-A domény, začátek PAS-B domény a oblast mezi nimi). Úroveň deuterace těchto sekvencí se s časem postupně zvyšovala.

K nejméně deuterovaným (deuterace méně než 20 % v čase 20 sekund) částem PAS-B domény (aminokyseliny 141–256 [83]) patřily úseky zahrnující aminokyseliny 150–176, 230–233 a 244–249. Sekvence 177–183, 207–229, 234–243 a 250–255 vykazovaly po 20 sekundách vyšší úroveň deuterace (více než 20 %). V případě všech doposud zmíněných částí PAS-B domény postupně v čase úroveň deuterace rostla. Nejvíce deuterovaná část (úroveň deuterace přibližně 50 %), u které ani v nejdelším časovém intervalu nedocházelo k výraznější změně deuterace (nárůst cca o 5 %), se nacházela mezi aminokyselinami 184–206. V případě sekvence 256–265 (segment spojující PAS-B doménu a oblast mezi PAS-B a GGDEF doménami) se rovněž jednalo o oblast vykazující vysokou deuterační úroveň (přibližně 40 % v čase 20 sekund), která s časem postupně narůstala.

Oblast mezi PAS-B a GGDEF doménami (aminokyseliny 257–409 [87]) byla více deuterovaná než PAS-A nebo PAS-B doména. Sekvence 266–270, 295–320, 356–368 a 384–407 vykazovaly v nejkratším inkubačním intervalu nižší úroveň deuterace (mezi 20–40 %). Vyšší úroveň deuterace (více než 40 % v čase 20 sekund) vykazovaly segmenty obsahující aminokyseliny 321–355 a 369–383. Úroveň deuterace v regionech zahrnujících aminokyseliny 302–322, 346–354 a 375–382 se v čase příliš neměnila (zvýšení maximálně o 5 %). Ve zbývajících částech oblasti mezi PAS-B a GGDEF doménami se postupně s časem zvyšovala úroveň deuterace o více než 5 %.

Po 20 sekundách náležely k méně deuterovaným částem (úroveň deuterace méně než 20 %) GGDEF domény (aminokyseliny 410–540 [87]) sekvence 408–415, 439–455 a 492–504. Nejnižší úroveň deuterace v čase 20 sekund vykazovala oblast obsahující aminokyseliny 492–504, jejíž hodnota po 2 hodinách vzrostla až o 43 %. Sekvence 416–438, 456–465, 472–491 a 514–537, 553–556 byly po 20 sekundách více deuterované (deuterace mezi 20–40 %) než předchozí popisované oblasti. Ještě vyšších deuterčních úrovní (více než 40 %) v nejkratším inkubačním intervalu dosahovaly regiony zahrnující aminokyseliny 466–471, 505–513 a 538–552 (poslední část GGDEF domény a začátek EAL domény). Ve většině částí GGDEF domény byl s časem pozorován postupný nárůst úrovně deuterace (alespoň o 10 %) kromě jediné oblasti obsahující aminokyseliny 538–544, kde po 2 hodinách reakce narostla míra deuterace přibližně o 5 %.

Po 20 sekundách byly v EAL doméně (aminokyseliny 549–803 [87]) méně deuterované (úroveň deuterace méně než 20 %) regiony zahrnující aminokyseliny 557–608, 615–644, 694–702, 718–728 a 745–785. Nejnižší úroveň deuterace (pod 10 %) z těchto regionů při všech inkubačních časech vykazovaly sekvence 581–586 a 622–626. Po 20 sekundách byla také velice málo deuterovaná oblast obsahující aminokyseliny 602–608, kde po 2 hodinách docházelo k nejvýraznějšímu zvýšení úrovně deuterace (až o 45 %) v celém proteinu. Oblasti zahrnující aminokyseliny 609–614, 645–693, 703–717, 729–744 a 786–807 vykazovaly po 20sekundové HDX reakci vyšší úroveň deuterace (více než 20 %). C-terminální region zahrnující aminokyseliny 786–807 byl po 2 hodinách jednou z nejvíce deuterovaných částí celého proteinu. Ve většině EAL domény docházelo k výraznějšímu nárůstu úrovně deuterace postupně s časem vyjma sekvencí 624–627 a 682–687, kde byl tento nárůst o něco nižší (přibližně 7 %).



Obrázek 4.13: Deuterační profil proteinu *EcDOS* Fe(III). Úroveň deuterace je uvedena v procentech a vztažena na nejvyšší možnou míru deuterace příslušného peptidu, která odpovídá počtu atomů vodíku v amidových vazbách tohoto peptidu [99]. Vodíko-deuteriová výměna probíhala v časových intervalech 20 sekund (modrá křivka), 2 minut (oranžová křivka), 20 minut (šedá křivka) a 2 hodin (žlutá křivka). V horní části obrázku je znázorněna reprezentace prvků sekundární struktury dle [85,90] – α -helix (válec) a β -skládaný list (šipka).

4.6.3 Deuterační profil proteinu *EcDOS* Fe(II)-O₂

Na obr. 4.14 (str. 70) je vyobrazen deuterační profil proteinu *EcDOS* Fe(II)-O₂, v jehož horní části je schematicky znázorněna sekundární struktura PAS-A domény a EAL domény na základě jejich vyřešených krystalových struktur [85,90]. Úroveň deuterace proteinu *EcDOS* Fe(II)-O₂ byla po 2 hodinách maximálně 63 % potenciálně vyměnitelných atomů vodíku za deuterium. Deuterační profil tohoto proteinu je níže popsán po jednotlivých částech tohoto hemoproteinu (PAS-A doména, PAS-B doména, oblast mezi PAS-B a GGDEF doménami, GGDEF doména a EAL doména [83]).

Nejméně deuterovanými částmi (úroveň deuterace méně než 20 %) PAS-A domény (1–139 [85]) byly po 20 sekundách HDX reakce oblasti zahrnující aminokyseliny 33–66 a 102–112, jejichž deuterace se s rostoucí délkou inkubace postupně zvyšovala. Vyšší úroveň deuterace (deuterace mezi 20–40 %) po 20 sekundách vykazovaly sekvence 67–101 a 113–132, jejichž deuterace s časem také postupně vzrůstala. Úroveň deuterace vyšší než 20 % v nejkratším inkubačním intervalu, která s časem narůstala o méně než 7 %, měl region zahrnující aminokyseliny 24–32. Po 20 sekundách byly nejvíce deuterované (úroveň deuterace více než 40 %) oblasti obsahující aminokyseliny 10–23 (N-konec proteinu) a 133–146 (zahrnující konec PAS-A domény a začátek PAS-B

domény). Úroveň deuterace první oblasti se s časem měnila minimálně, zatímco deuterace druhé oblasti se postupně s časem zvyšovala.

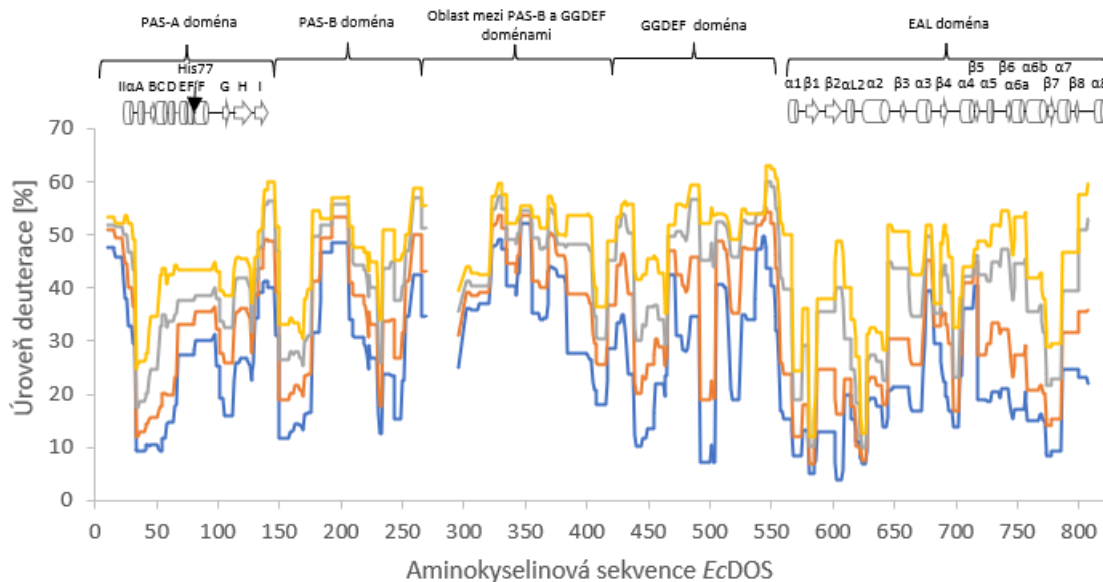
Nejnižší úroveň deuterace (méně než 20 %) v čase 20 sekund, v PAS-B doméně (141–256 [83]) měly sekvence 150–176, 230–233 a 244–249. Ve srovnání s předchozími popisovanými sekvencemi byly po 20 sekundách HDX reakce více deuterované (úroveň deuterace přesahující 20 %) oblasti zahrnující aminokyseliny 147–149, 177–183, 207–229, 234–243 a 250–257. Nejvyšší úroveň deuterace (více než 40 %) po 20 sekundách v této doméně vykazoval úsek obsahující aminokyseliny 184–206 a 258–265. V celé PAS-B doméně se deuterace postupně v čase zvyšovala. Tento nárůst byl nejnižší v případě sekvence 184–192.

Úroveň deuterace oblasti mezi PAS-B a GGDEF doménami (257–409 [87]) po 20 sekundách přesahovala 20 %. K méně deuterovaným (úroveň deuterace mezi 20–40 % v čase 20 sekund) částem oblasti mezi PAS-B a GGDEF doménami náležely úseky obsahující aminokyseliny 266–270, 295–320, 356–368 a 384–407. Více deuterované (úroveň deuterace více než 40 % v čase 20 sekund) části této oblasti zahrnovaly sekvence 258–265, 321–355 a 369–383. V oblasti mezi PAS-B a GGDEF doménami se postupně s časem zvyšovala míra deuterace, přičemž její nejnižší nárůst (o méně než 7 %) byl pozorován v sekvencích 302–322, 346–354 a 375–382.

Po 20 sekundách měly nižší úroveň deuterace (méně než 20 %) v GGDEF doméně (410–540 [87]) oblasti zahrnující aminokyseliny 408–415, 439–455 a 492–504. Nejméně deuterovanou oblastí byla pak sekvence 492–504, jejíž deuterace se postupně v čase zvyšovala až o 45 %. V nejkratším inkubačním čase byly více deuterované (úroveň deuterace mezi 20–40 %) úseky obsahující aminokyseliny 416–438, 456–465, 472–491 a 514–537. Nejvyšší deuterací úroveň (více než 40 % v čase 20 sekund) vykazovaly sekvence 466–471, 505–513 a 538–552 (zahrnující konec GGDEF domény a začátek EAL domény). V celé GGDEF doméně docházelo s časem k postupnému nárůstu úrovně deuterace (o více než 10 %) s výjimkou regionu zahrnujícího aminokyseliny 538–544, kde byl tento nárůst méně výrazný (přibližně 5 %).

V EAL doméně (549–803 [87]) vykazovaly nižší úroveň deuterace (méně než 20 %) po 20 sekundách výměnné reakce regiony zahrnující aminokyseliny 557–644, 663–672, 692–702 a 718–785. V nejkratším inkubačním intervalu měly o něco nižší deuterací úroveň (méně než 10 %) z těchto regionů sekvence 568–574, 581–586, 602–608, 622–627 a 773–785. Úroveň deuterace sekvence 602–608 postupně s časem narůstala až o 45 %, což je jeden z největších nárůstů deuterace v celém proteinu *EcDOS Fe(II)-O₂*.

Více deuterované (úroveň deuterace více než 20 % v čase 20 sekund) byly oblasti obsahující aminokyseliny 553–556, 645–662, 673–691, 703–717 a 786–807. Míra deuterace se s časem postupně zvyšovala v celé EAL doméně, přičemž nejnižší nárůst (méně než 7 %) byl pozorován v sekvenci 624–627 a 682–687.



Obrázek 4.14: Deuterační profil proteinu *EcDOS* Fe(II)-O₂. Úroveň deuterace je uvedena v procentech a vztažena na nejvyšší možnou míru deuterace příslušného peptidu, která odpovídá počtu atomů vodíku v amidových vazbách tohoto peptidu [99]. Vodíko-deuteriová výměna probíhala v časových intervalech 20 sekund (modrá křivka), 2 minut (oranžová křivka), 20 minut (šedá křivka) a 2 hodin (žlutá křivka). V horní části obrázku je znázorněna reprezentace prvků sekundární struktury dle [85,90] – α -šroubovice (válec) a β -skládaný list (šipka).

4.6.4 Deuterační profil proteinu *EcDOS* His77A1a

Na obr. 4.15 (str. 72) je vyobrazen deuterační profil proteinu *EcDOS* His77A1a (apofорма proteinu *EcDOS* [84]). Míra deuterace tohoto proteinu v nejdelším časovém rámci byla rovna maximálně 60 % potenciálně vyměnitelných atomů vodíku za deuterium. Deuterační profil tohoto proteinu je níže popsán po jednotlivých částech *EcDOS* His77A1a (PAS-A doména, PAS-B doména, oblast mezi PAS-B a GGDEF doménami, GGDEF doména a EAL doména [83]).

Již po 20 sekundách HDX reakce přesahovala úroveň deuterace PAS-A domény (1–139 [85]) 20 %. K méně deuterovaným částem (úroveň deuterace mezi 20–40 %) po 20 sekundách patřily sekvence 33–66, 102–132 a 147–149, jejichž míra deuterace postupně v čase rostla. V nejkratším inkubačním intervalu byly více deuterované (úroveň deuterace nad 40 %) segmenty zahrnující aminokyseliny 10–32, 67–101 a 133–146. S časem úroveň deuterace těchto segmentů postupně narůstala (o 7–9 %).

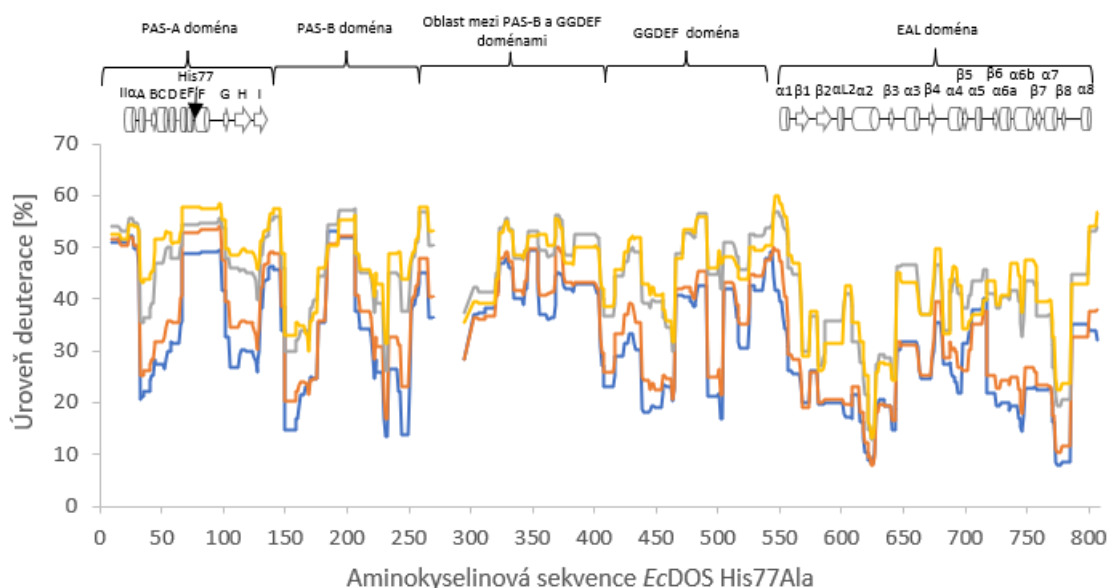
Nejméně deuterovanými (úroveň deuterace méně než 20 %) částmi PAS-B domény (141–256 [83]) v nejkratším inkubačním čase byly regiony zahrnující aminokyseliny 150–161, 230–233 a 244–249, jejichž míra deuterace se postupně s časem zvyšovala. Více deuterovanými oblastmi (úroveň deuterace mezi 20–40 %) po 20 sekundách byly sekvence 162–182, 207–229, 234–243 a 250–255, jejichž míra deuterace s rostoucí délkou inkubace také postupně narůstala. Nejvyšší úroveň deuterace (více než 40 %) vykazovaly oblasti zahrnující aminokyseliny 183–206 a 256–265. Deuterace obou oblastí se s časem měnila velice málo (o méně než 5 %).

Míra deuterace oblastí mezi PAS-B a GGDEF doménami (257–409 [87]) v nejkratším inkubačním intervalu přesahovala 20 %. Nižší úroveň deuterace (mezi 20–40 %) této oblasti po 20 sekundách vykazovaly regiony zahrnující aminokyseliny 266–270, 295–320, 356–368 a 405–408. Více deuterovanými částmi (míra deuterace více než 40 %) byly úseky obsahující aminokyseliny 321–355 a 369–404. Nejméně výrazné změny úrovně deuterace v čase (nárůst o méně než 5 %) vykazovaly části zahrnující aminokyseliny 302–322, 346–354 a 375–383.

K nejméně deuterovaným (úroveň deuterace méně než 20 % v čase 20 sekund) částem GGDEF domény (410–540 [87]) náležely úseky zahrnující aminokyseliny 439–454 a 502–504. Po 20 sekundách reakce vykazovaly vyšší míru deuterace (mezi 20–40 %) sekvence 409–438, 455–465, 491–501 a 515–525. Nejvyšší úroveň deuterace (více než 40 %) po 20 sekundách HDX reakce měly oblasti obsahující aminokyseliny 466–491, 505–514 a 526–549. S časem se nejméně měnila úroveň deuterace (postupný nárůst o méně než 7 %) regionů zahrnujících aminokyseliny 505–514 a 537–544. V ostatních částech GGDEF domény se deuterace postupně s časem zvyšovala o více než 7 %.

Nižší úroveň deuterace (méně než 20 %) EAL domény (549–803 [87]) po 20sekundové HDX reakci měly sekvence 602–644, 718–747 a 771–785. Nejméně deuterované (úroveň deuterace nižší než 10 %) části této domény po 20 sekundách byly oblasti zahrnující aminokyseliny 612–626 a 773–785. Úroveň deuterace těchto sekvencí postupně s časem narůstala s výjimkou sekvence 623–634, kde nevykazovala výraznější změny v čase (nárůst o méně než 7 %). Vyšší úroveň deuterace (mezi 20–40 %) po 20 sekundách byla pozorována v oblastech zahrnujících aminokyseliny 550–601, 645–714, 748–770 a 786–807. Nejvyšší deuterací úroveň (více než 40 %) byla zaznamenána v případě sekvence 715–717. V částech EAL domény, jejichž úroveň deuterace přesahovala 20 % nebo 40 % v čase 20 sekund, docházelo k postupnému

zvyšování deuterace s časem kromě regionů zahrnujících aminokyseliny 682–687 a 698–717, kde se deuterace měnila minimálně (nárůst o méně než 5 %).



Obrázek 4.15: Deuterační profil proteinu *EcDOS His77Ala*. Úroveň deuterace je uvedena v procentech a vztažena na nejvyšší možnou míru deuterace příslušného peptidu, která odpovídá počtu atomů vodíku v amidových vazbách tohoto peptidu [99]. Vodíko-deuteriová výměna probíhala v časových intervalech 20 sekund (modrá křivka), 2 minut (oranžová křivka), 20 minut (šedá křivka) a 2 hodin (žlutá křivka). V horní části obrázku je znázorněna reprezentace prvků sekundární struktury proteinu *EcDOS* dle [85,90] – α -šroubovice (válec) a β -skládaný list (šipka).

4.6.5 Porovnání deuteračních profilů *EcDOS Fe(III)* a *EcDOS Fe(II)-O₂*

Výsledky HDX-MS analýzy proteinu *EcDOS* ve formách *Fe(III)* (vizte obr. 4.13, str. 68) a *Fe(II)-O₂* (vizte obr. 4.14, str. 70) vykazovaly velice podobný trend. Po 20sekundové HDX reakci je úroveň deuterace proteinu *EcDOS Fe(III)* až na výjimky vyšší oproti úrovni deuterace *EcDOS Fe(II)-O₂*. Na obr. 4.16 (str. 74) je znázorněn rozdíl deuteračních profilů proteinu *EcDOS Fe(II)-O₂* a proteinu *EcDOS Fe(III)* pro 20sekundové a 20minutové výměnné reakce. Jelikož rozdíl úrovní deuterace obou proteinů není příliš výrazný (rozmezí –4 % až + 6 %), jsou níže popsány rozdíly deuterace přesahující ± 2 %.

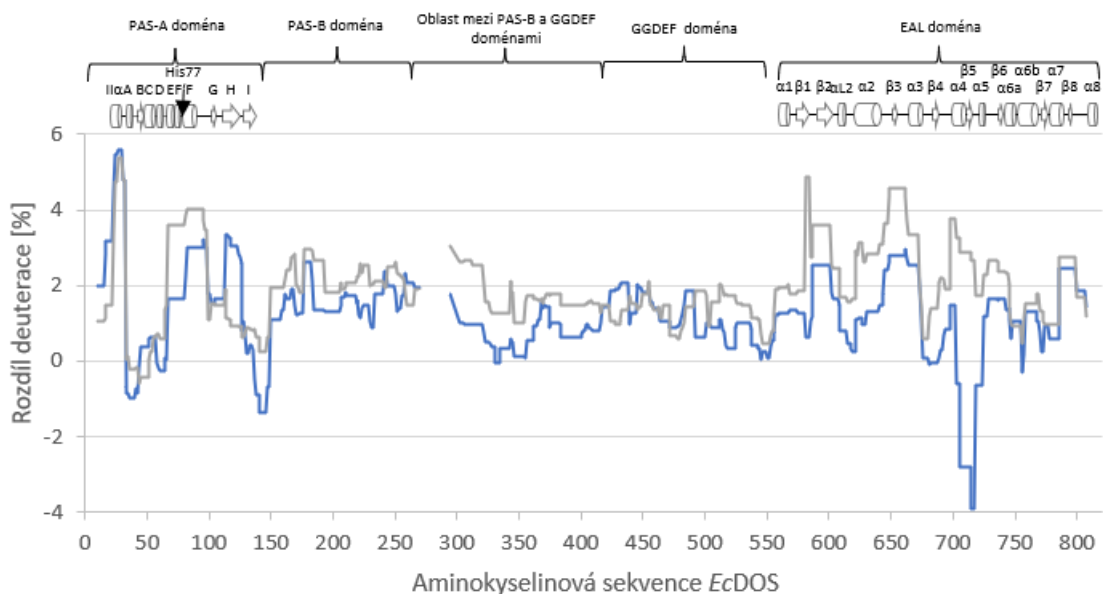
PAS-A doména (1–139 [85]) *EcDOS Fe(III)* byla ve srovnání s PAS-A doménou *EcDOS Fe(II)-O₂* po 20sekundové HDX reakci více deuterovaná v úsecích zahrnujících aminokyseliny 10–32, 81–98 a 113–126 a po 20minutové výměnné reakci v úsecích zahrnujících aminokyseliny 23–32 a 67–98. Rozdíly v úrovni deuterace sekvence 24–30 v čase 20 sekund a sekvence 27–30 v čase 20 minut dosahovaly až + 5,5 %.

PAS-B doména (141–256 [83]) *EcDOS* Fe(III) vykazovala vyšší deuteraci oproti PAS-B doméně *EcDOS* Fe(II)-O₂ po 20 sekundách v sekvencích 177–183 a 241–249 a po 20 minutách v sekvencích 150–172, 177–192, 206–240 a 244–257. Největší rozdíl v úrovni deuterace (téměř + 3 %) byl zaznamenán po 20minutové HDX reakci v případě sekvence 177–183.

Oblast mezi PAS-B a GGDEF doménami (257–409 [87]) *EcDOS* Fe(III) byla oproti téže oblasti *EcDOS* Fe(II)-O₂ více deuterovaná po 20sekundové HDX reakci v sekvenci 258–270 a po 20minutové HDX reakci v sekvencích 266–270, 295–322 a 343–344.

GGDEF doména (410–540 [87]) *EcDOS* Fe(III) vykazovala ve srovnání s GGDEF doménou *EcDOS* Fe(II)-O₂ vyšší deuteraci po 20 sekundách v úsecích zahrnujících aminokyseliny 428–438 a 445–448 a po 20 minutách v úseku obsahujícím aminokyseliny 512–514 a také v případě 455. aminokyseliny.

EAL doména (549–803 [87]) *EcDOS* Fe(III) byla oproti EAL doméně *EcDOS* Fe(II)-O₂ po 20sekundové HDX reakci více deuterovaná v sekvencích 587–601, 645–672 a 786–799 a po 20minutové HDX reakci v sekvencích 557–567, 581–608, 622–673, 688–693, 698–717, 725–745 a 786–799. Největší rozdíl v úrovních deuterace byl pozorován v čase 20 minut v regionech obsahujících aminokyseliny 581–584 (přibližně + 5 %), 648–662 (okolo + 4,5 %) a 698–702 (cca + 4 %). Nižší míra deuterace EAL domény *EcDOS* Fe(III) ve srovnání s EAL doménou *EcDOS* Fe(II)-O₂ byla pozorována po 20 sekundách v sekvenci 706–717, přičemž v úseku zahrnujícím aminokyseliny 715–717 byl tento rozdíl téměř –4 %.



Obrázek 4.16: Porovnání deuteričního profilu proteinu *EcDOS* Fe(III) a *EcDOS* Fe(II)-O₂. Rozdíl deuterace byl získán odečtením úrovně deuterace *EcDOS* Fe(II)-O₂ od úrovně deuterace *EcDOS* Fe(III) a vyjádřen v závislosti na aminokyselinové sekvenci proteinu. Křivky představují rozdíl hodnot úrovně deuterace proteinu *EcDOS* Fe(III) oproti proteinu *EcDOS* Fe(II)-O₂ v časových intervalech 20 sekund (modrá křivka) a 20 minut (šedá křivka). V horní části obrázku je znázorněna reprezentace prvků sekundární struktury proteinu *EcDOS* dle [85,90] – α -šroubovice (válec) a β -skládání list (šipka).

4.6.6 Porovnání deuteričních profilů *EcDOS* Fe(III) a *EcDOS* His77Ala

Výsledky HDX-MS analýzy proteinu *EcDOS* Fe(III) (vizte obr. 4.13, str. 68) a proteinu *EcDOS* His77Ala, apofomy hemoproteinu *EcDOS* [84] (vizte obr. 4.15, str. 72), vykazovaly obdobný trend. V nejkratším měřeném časovém intervalu byla celková úroveň deuterace proteinu *EcDOS* His77Ala až na výjimky vyšší oproti úrovni deuterace *EcDOS* Fe(III). Na obr. 4.17 (str. 76) je znázorněn rozdíl deuteričních profilů proteinu *EcDOS* His77Ala a proteinu *EcDOS* Fe(III) pro 20sekundové a 20minutové výměnné reakce. Změny deuterace *EcDOS* His77Ala a *EcDOS* Fe(III) jsou níže popsány podrobněji.

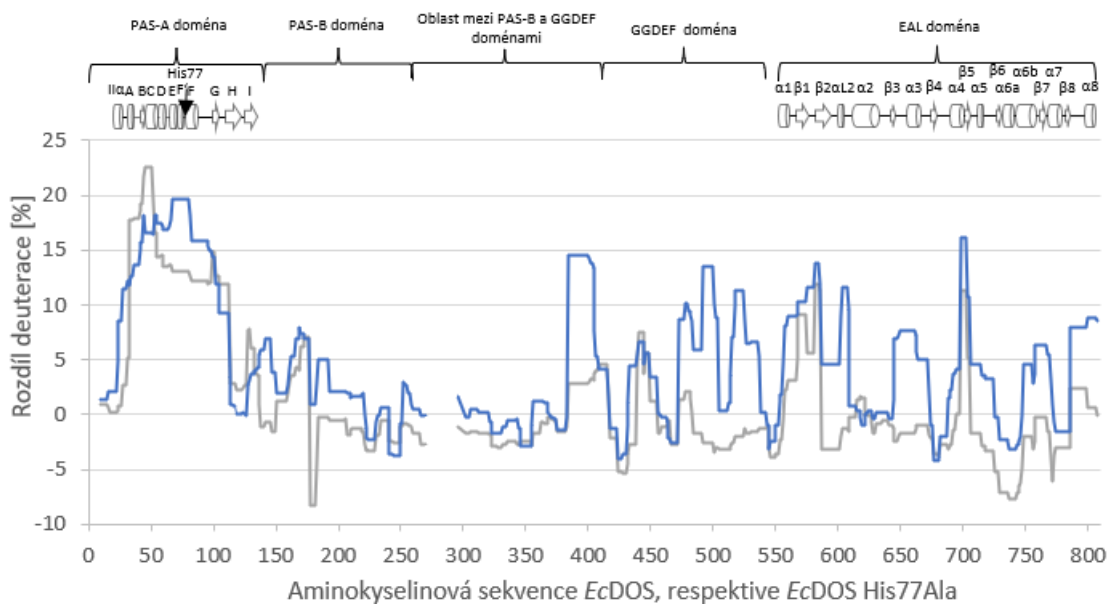
PAS-A doména (1–139 [85]) proteinu *EcDOS* His77Ala byla oproti PAS-A doméně *EcDOS* Fe(III) v čase 20 sekund i 20 minut více deuterovaná. Výraznější deuteriční rozdíly byly pozorovány pro 20sekundovou HDX reakci v sekvenci 24–112 a pro 20minutovou HDX reakci v sekvenci 33–112. Úroveň deuterace počáteční části této domény (10–22) byla v případě *EcDOS* Fe(III) a *EcDOS* His77Ala velice podobná (rozdíly v deuteričním profilu do $\pm 5\%$). V koncové části PAS-A domény (114–139) byly rozdíly deuterace méně významné než v prostřední části PAS-A domény. Jednalo se

například o sekvenci 127–132 *EcDOS His77Ala*, která měla po 20 minutách vyšší deuteraci, než tomu bylo v případě *EcDOS Fe(III)*.

PAS-B doména (141–256 [83]) a oblast mezi PAS-B a GGDEF doménami (257–409 [87]) proteinů *EcDOS Fe(III)* a *EcDOS His77Ala* vykazovaly většinou menší difference v úrovni deuterace (do $\pm 5\%$). Jediným úsekem *EcDOS His77Ala*, který měl po 20minutové HDX reakci nižší deuteraci než v případě *EcDOS Fe(III)*, byl region obsahující aminokyseliny 177–182. Části PAS-B domény a oblasti mezi PAS-B a GGDEF doménami proteinu *EcDOS His77Ala*, které byly po 20sekundové HDX reakci oproti *EcDOS Fe(III)* více deuterované, zahrnovaly sekvence 137–146, 162–176 a 384–407. Poslední zmíněná sekvence vykazovala nejvyšší rozdíl deuterace (až $+15\%$). Po 20 minutách byla úroveň deuterace *EcDOS His77Ala* oproti *EcDOS Fe(III)* vyšší v sekvenci 170–176.

Vyšší úroveň deuterace GGDEF domény (410–540 [87]) *EcDOS His77Ala* ve srovnání *EcDOS Fe(III)* se projevila v regionech zahrnujících aminokyseliny 439–448, 472–504 a 515–537 pro 20 sekund a oblasti aminokyselin 439–448 pro 20 minut. Naopak nižší míru deuterace této domény v případě proteinu *EcDOS His77Ala* oproti *EcDOS Fe(III)* vykazovala sekvence 424–430. Ve zbývajících částech této domény nebyly difference v úrovni deuteraci mezi *EcDOS Fe(III)* a *EcDOS His77Ala* příliš významné (rozdíl deuterace do $\pm 5\%$).

Kromě méně výrazných deuteráčnických rozdílů (do $\pm 5\%$) byla v případě 20sekundové HDX reakce EAL doména (549–803 [87]) proteinu *EcDOS His77Ala* v porovnání s EAL doménou *EcDOS Fe(III)* více deuterovaná v úsecích zahrnujících aminokyseliny 557–586, 602–608, 645–672, 689–705, 758–769 a 786–807. Po 20 minutách vykazovala vyšší úroveň deuterace sekvence 567–586 a 698–705 proteinu *EcDOS His77Ala* oproti *EcDOS Fe(III)*. Naopak nižší deuteráčnická úroveň proteinu *EcDOS His77Ala* v porovnání s *EcDOS Fe(III)* byla zaznamenána pro 20minutovou HDX reakci v oblastech obsahujících aminokyseliny 725–747 a 771–772.



Obrázek 4.17: Porovnání deuteričního profilu proteinu *EcDOS* His77Ala (apoforna proteinu *EcDOS* [84]) a proteinu *EcDOS* Fe(III). Rozdíl deuterace byl získán odečtením úrovně deuterace *EcDOS* Fe(III) od úrovně deuterace *EcDOS* His77Ala a vyjádřen v závislosti na aminokyselinné sekvenci proteinu. Křivky představují rozdíl hodnot úrovně deuterace proteinu *EcDOS* His77Ala oproti proteinu *EcDOS* Fe(III) v časových intervalech 20 sekund (modrá křivka) a 20 minut (šedá křivka). V horní části obrázku je znázorněna reprezentace prvků sekundární struktury proteinu *EcDOS* dle [85,90] – α-šroubovice (válec) a β-skládaný list (šipka).

4.6.7 Porovnání deuteričních profilů *EcDOS* His77Ala a *EcDOS* Fe(II)-O₂

Výsledky HDX-MS analýzy proteinu *EcDOS* His77Ala, apoforny hemoproteinu *EcDOS* [84] (vizte obr. 4.15, str. 72), a proteinu *EcDOS* Fe(II)-O₂ (vizte obr. 4.14, str. 70) vykazovaly podobný trend. Po 20sekundové výměnné reakci byla úroveň deuterace proteinu *EcDOS* His77Ala většinou vyšší ve srovnání s úrovní deuterace *EcDOS* Fe(II)-O₂. Na obr. 4.18 (str. 78) je znázorněn rozdíl deuteričních profilů proteinů *EcDOS* His77Ala a *EcDOS* Fe(II)-O₂ pro 20sekundové a 20minutové HDX reakce. Kromě méně výrazných rozdílů v deuteričních profilech (do ± 5 %) byly zaznamenány také větší změny v úrovni deuterace těchto dvou proteinů, které jsou popsány níže.

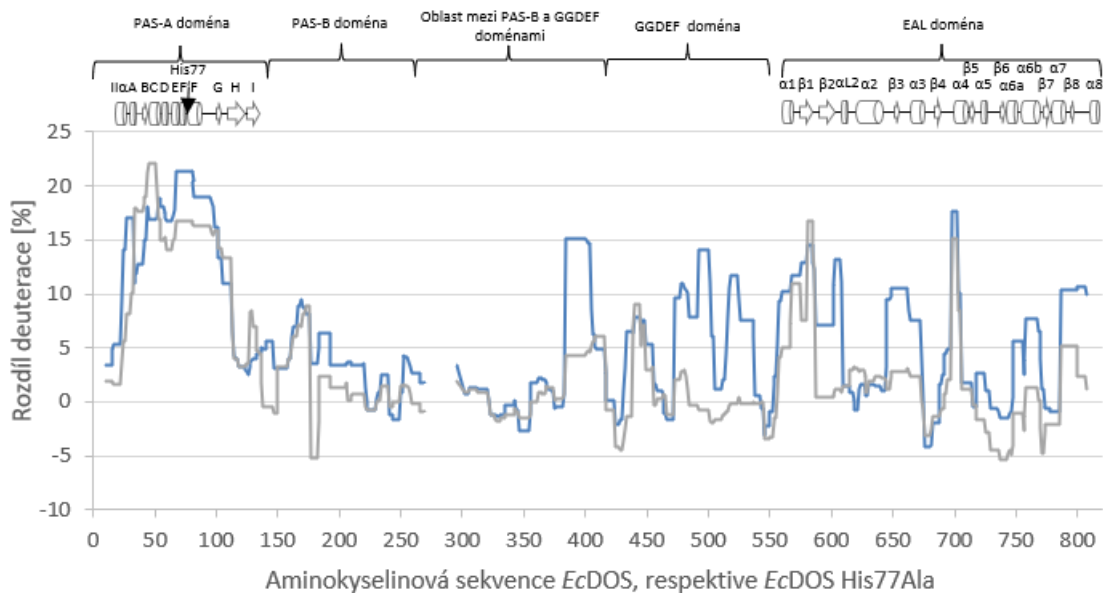
PAS-A doména (1–139 [85]) proteinu *EcDOS* His77Ala vykazovala ve srovnání s PAS-A doménou *EcDOS* Fe(II)-O₂ vyšší úroveň deuterace. Největší rozdíly byly pozorovány v případě sekvencí 16–113 a 137–146 v inkubačním čase 20 sekund a sekvence 24–113 a 127–132 v inkubačním čase 20 minut. Rozdíly v úrovni deuterace sekvence 24–113 v obou časech přesáhly 10 %.

PAS-B doména (141–256 [83]) *EcDOS His77Ala* oproti PAS-B doméně *EcDOS Fe(II)-O₂* byla po 20 sekundách více deuterovaná v oblastech zahrnujících aminokyseliny 161–176 a 183–192 a po 20 minutách v oblasti zahrnující aminokyseliny 161–176. Naopak vyšší úroveň deuterace PAS-B domény *EcDOS Fe(II)-O₂* ve srovnání s *EcDOS His77Ala* byla zaznamenána v regionu obsahujícím aminokyseliny 177–182.

V případě oblasti mezi PAS-B a GGDEF doménami (257–409 [87]) se rozdíl deuterace obou proteinů většinou pohyboval v intervalu ± 5 %. Výjimkou byla sekvence 384–415, jejíž deuterace byla po 20sekundové HDX reakci až o + 15 % vyšší v případě *EcDOS His77Ala* oproti *EcDOS Fe(II)-O₂*. Po 20 minutách vykazovala vyšší úroveň deuterace v případě *EcDOS His77Ala* také oblast zahrnující aminokyseliny 405–415.

GGDEF doména (410–540 [87]) proteinu *EcDOS His77Ala* oproti GGDEF doméně *EcDOS Fe(II)-O₂* byla po 20sekundové HDX reakci více deuterovaná v sekvencích 433–455, 472–504 a 515–537 a po 20minutové HDX reakci v sekvenci 439–438. V případě oblasti zahrnující aminokyseliny 478–483 a 492–504 přesáhl tento rozdíl v čase 20 sekund 10 %. Nižší míra deuterace GGDEF domény *EcDOS His77Ala* ve srovnání s toutéž doménou *EcDOS Fe(II)-O₂* se projevila v úseku zahrnujícím aminokyseliny 424–430 (rozdíl deuterace –4,5 %).

Vyšší úroveň deuterace EAL domény (549–803 [87]) *EcDOS His77Ala* ve srovnání s EAL doménou *EcDOS Fe(II)-O₂* byla pozorována v regionech obsahující aminokyseliny 515–537, 556–608, 645–672, 698–705, 758–769 a 786–807 v čase 20 sekund a úsecích zahrnující aminokyseliny 560–586 a 698–705 v čase 20 minut, přičemž rozdíl deuterace vyšší než 10 % po 20sekundové HDX reakci vykazovaly sekvence 517–524, 560–586, 648–662, 698–705 a 786–807 a po 20minutové HDX reakci sekvence 568–574, 581–586 a 698–702. Nižší míra deuterace EAL domény *EcDOS His77Ala* ve srovnání s EAL doménou *EcDOS Fe(II)-O₂* se projevila v oblastech zahrnujících aminokyseliny 737–742 a 771–772 v čase 20 minut.



Obrázek 4.18: Porovnání deuteričního profilu proteinu *EcDOS* His77Ala (apoforna proteinu *EcDOS* [84]) a proteinu *EcDOS* Fe(II)-O₂. Rozdíl deuterace byl získán odečtením úrovně deuterace *EcDOS* Fe(II)-O₂ od úrovně deuterace *EcDOS* His77Ala a vyjádřen v závislosti na aminokyselinové sekvenci proteinu. Křivky představují rozdíl hodnot úrovně deuterace proteinu *EcDOS* His77Ala oproti proteinu *EcDOS* Fe(II)-O₂ v časových intervalech 20 sekund (modrá křivka) a 20 minut (šedá křivka). V horní části obrázku je znázorněna reprezentace prvků sekundární struktury proteinu *EcDOS* dle [85,90] – α -šroubovice (válec) a β -skládaný list (šipka).

5 Diskuse

Protein *EcDOS*, kterému se tato diplomová práce věnuje, náleží do skupiny hemových senzorů plynů. Na základě detekce molekuly plynu (například kyslíku) ve svém okolí *EcDOS* reguluje v *E. coli* homeostázu druhého posla c-di-GMP [44], který se účastní mimo jiné regulace tvorby biofilmu [79]. Biofilm umožňuje nejenom *E. coli*, ale také dalším (například patogenním) bakteriím přežít v nepříznivých podmínkách [100,101] a chrání je před přístupem antibiotik. Tím podporuje jejich rezistenci vůči antibakteriální léčbě [100], která je významnou hrozbou pro lidské zdraví a v posledních letech se dále prohlubuje [102]. Možným řešením tohoto problému je vývoj antibiotik nové generace, jejichž působení by mohlo být založeno na ovlivnění buněčných funkcí, kterých se hemové senzory plynů účastní a mezi něž patří právě výše zmíněná tvorba biofilmu [26,101]. Proto je nutné detailně prozkoumat mechanismus přenosu signálu těmito hemoproteiny, případně také vztah jejich struktury a funkce [25].

Proteiny *EcDOS* a *EcDOS His77Ala* (apofорма *EcDOS* [84]) byly připraveny rekombinantní expresí v systému *E. coli* (vizte kap. 4.1). Zdá se, že tyto proteiny nebyly pro buňky toxické, jelikož množství buněčné masy získané po expresi bylo srovnatelné s analogickými experimenty zahrnujícími *AfgCHK* nebo *YddV* [103,104].

Oba proteiny byly purifikovány afinitní chromatografií s využitím histidinové kotvy, která je jednou z nejrozšířenějších afinitních značek používaných pro purifikaci rekombinantních proteinů [105]. Jelikož došlo k odstranění velkého množství kontaminujících proteinů neinteragujících s afinitním nosičem (vizte dráhy 1–3, obr. 4.2 A a 4.2 B, str. 51), ukázala se tato strategie jako úspěšná. Histidinová kotva nebyla pro další experimenty s proteiny *EcDOS* a *EcDOS His77Ala* odstraněna, neboť většinou nemá výrazný vliv na strukturu proteinu, ke kterému je připojena [105]. Na druhou stranu se jedná o sekvenci bohatou na histidin, a právě tato aminokyselina je známá výbornou schopností interagovat s atomem železa hemu [19]. V případě *EcDOS* Yoshimura a kolektiv však porovnáním proteinu s histidinovou kotvou a bez ní pozorovali, že její přítomnost nemá vliv na UV-VIS spektra, oligomerní stav, ani na enzymovou aktivitu tohoto proteinu [84].

Úspěšnost izolace proteinů *EcDOS* i *EcDOS His77Ala* je patrná z elektroforeogramů finálních preparátů těchto proteinů (vizte dráhy 4–6, obr. 4.2 A a 4.2 B, str. 51). Průměrný výtěžek izolace proteinu *EcDOS* z 1 litru TB média byl mírně vyšší než průměrný výtěžek izolace jeho apoformy, proteinu *EcDOS His77Ala* [84] (vizte kap. 4.2). Molekula hemu

tak pravděpodobně stabilizuje *EcDOS*, což bylo možné očekávat, jelikož se jedná o jeho prostetickou skupinu [44]. Výtěžek izolace obou proteinů byl vyšší než v případě izolace eukaryotických sensorových hemoproteinů (například senzoru hemu Bach1) v naší laboratoři [106], avšak byl řádově nižší než výtěžek izolace kyslíkových sensorů *AfGcHK* a *YddV* [104]. Navzdory tomu bylo získáno množství proteinu *EcDOS*, respektive *EcDOS His77Ala* dostatečné pro plánované experimenty.

Je více než pravděpodobné, že připravené preparáty proteinů zaujmají v roztoku nativní konformaci, jak bylo ověřeno UV-VIS spektrofotometrií (vizte kap. 4.3 a 4.4). Poloha Soretova pásu obou forem proteinu *EcDOS*, Fe(III) (vizte červená křivka, obr. 4.3, str. 52) a Fe(II)-O₂ (vizte zelená křivka, obr. 4.3), se shoduje s výsledky uvedenými v literatuře (vlnová délka 417 nm) [96], a tudíž i způsob koordinace atomu železa hemu v příslušné formě *EcDOS* je pravděpodobně totožný jako ve zmíněné publikaci [96]. Pozice Q-pásů *EcDOS* Fe(III), respektive *EcDOS* Fe(II)-O₂ se lišily maximálně o 2 nm oproti literatuře [96]. Tato diskrepance by mohla být přisouzena přijatelné experimentální odchylce.

Také v případě *EcDOS His77Ala* bylo dle předpokladu spektrofotometricky potvrzeno, že neobsahuje molekulu hemu ani s ní specificky neinteraguje, protože nebylo pozorováno žádné charakteristické absorpční maximum preparátu kolem 420 nm (vizte černá křivka, obr. 4.4, str. 53), ani po přidavku roztoku heminu (vizte modrá křivka, obr. 4.4, str. 53). Protein *EcDOS His77Ala* tedy postrádá schopnost vázat hem a jedná se o apoformu *EcDOS*. Stejného závěru bylo dosaženo také v literatuře [84].

Pokud je preparát *EcDOS* Fe(III) (vizte zelená křivka, obr. 4.6 A, str. 56 a tab. 4.1, str. 57), nebo *EcDOS His77Ala* (vizte zelená křivka, obr. 4.8, str. 59 a tab. 4.3, str. 60) vystaven teplotnímu šoku (rychlý přechod mezi -80 °C a -20 °C), zdá se, že má protein tendenci vytvářet vyšší agregáty. Procedura, která se jeví jako vhodná pro to, abychom obdrželi nativní stav, je inkubace preparátu proteinu *EcDOS* Fe(III), respektive *EcDOS His77Ala* při teplotě 0 °C po dobu alespoň 1,5 hodiny (vizte černá a modrá křivka, obr. 4.6 B, str. 56 a tab. 4.1, str. 57, nebo černá křivka, obr. 4.8, str. 59 a tab. 4.3, str. 60) a tato byla aplikována i pro všechny další experimenty. Optimální by dále bylo, kdyby byly pro všechny další experimenty purifikované preparáty *EcDOS* Fe(III) a *EcDOS His77Ala* zpracovány bezprostředně po izolaci a nemusely být podrobeny snížení teploty na -80 °C (vizte šedá křivka, obr. 4.6 A, str. 56 a také obr. 4.1 A, str. 50, tab. 4.1, str. 57, respektive vizte šedá křivka, obr. 4.8, str. 59 a také vizte obr. 4.1 B, str. 50 a vizte tab. 4.3,

str. 60). To však vzhledem k časové náročnosti izolace obou proteinů a plánovaných experimentů nebylo technicky možné zajistit.

Úkolem této diplomové práce bylo také stanovení oligomerního stavu různých forem proteinu *EcDOS* (tj. *EcDOS* Fe(III), *EcDOS* Fe(II)-O₂ a *EcDOS* His77Ala), k čemuž byla zvolena metoda gelové permeační chromatografie (vizte kap. 4.5). S výjimkou vysokomolekulární formy eluované s mrtvým objemem kolony se *EcDOS* Fe(III) v roztoku vyskytoval ve dvou oligomerních stavech – nejvyšším oligomerním stavu a ve středním oligomerním stavu separovaném kolonou (vizte fialová křivka, obr. 4.6 A, černá a modrá křivka, obr. 4.6 B, str. 56 a tab. 4.1, str. 57). Střední oligomerní stav měl dle kalibrace použité kolony (vizte vztah 4.1, str. 54) molekulovou hmotnost vyšší než 200 kDa (vizte tab. 4.1, str. 57). Pravděpodobně se jednalo o dimerní formu *EcDOS* Fe(III), přestože byla molekulová hmotnost této formy mírně nadhodnocena (molekulová hmotnost *EcDOS* vypočtená dle aminokyselinové sekvence je 93 kDa [87,97]). Molekulová hmotnost nejvyššího oligomerního stavu dle kalibrace kolony přesahovala 600 kDa a podle poměru experimentem zjištěné molekulové hmotnosti a teorií vypočtené molekulové hmotnosti by se mělo jednat o heptamer (vizte tab. 4.1). Přítomnost dimeru (vizte výše) však naznačuje, že další vyšší oligomerní forma bude spíše násobkem dvou – tedy tetramer, nebo oktamer. Jelikož molekulová hmotnost dimeru byla nadhodnocena, můžeme se domnívat, že tomu tak bylo také v případě vyšší oligomerní formy. Navíc mezi píkem náležícím nejvyšší oligomerní formě a píkem patřícím dimerní formě žádný jiný pík na chromatogramu zaznamenaný nebyl, a s velkou pravděpodobností tedy tento pík odpovídá tetrameru. Vyšší molekulová hmotnost oligomerního stavu zjištěná experimentem by mohla být zapříčiněna protáhlým tvarem proteinu *EcDOS*. K této úvaze vede skutečnost, že nebyla zaznamenána lineární závislost mezi jeho molekulovou hmotností a hydrodynamickým poloměrem [92], na jehož základě gelová permeační chromatografie rozděluje molekuly [107]. Hydrodynamický poloměr *EcDOS* se odchyluje od korelační přímky hydrodynamických poloměrů standardních globulárních proteinů [92] (v této diplomové práci byly za účelem kalibrace dané kolony použity v podstatě proteiny globulární, vizte kap. 4.5). *EcDOS* je tak kvůli svému pravděpodobně protáhlému tvaru eluován při nižším objemu, než by odpovídalo elučnímu objemu globulárního proteinu o stejné molekulové hmotnosti. Dále bylo zjištěno, že uložení preparátu *EcDOS* Fe(III) při –80 °C a způsob jeho temperování má vliv na zastoupení oligomerních stavů tohoto proteinu ve finálním roztoku. Když je preparát ošetřen dle ideálního postupu (inkubace při teplotě 0 °C po dobu alespoň

1,5 hodiny, vizte černá a modrá křivka, obr. 4.6 B, str. 56 a tab. 4.1, str. 57), převažuje tetramerní forma nad dimerní. Inkubační preparátu při 0 °C po dobu 4 hodin a dále při 20 °C po dobu 3 hodin (vizte fialová křivka, obr. 4.6 A, str. 56 a tab. 4.1, str. 57) se pravděpodobně ustavuje rovnováha oligomerních stavů a pozorujeme srovnatelné zastoupení tetramerní a dimerní formy. Naopak není-li preparát vystaven teplotnímu šoku, převažuje dimerní forma *EcDOS* Fe(III) (vizte šedá křivka, obr. 4.6 A, str. 56 a také obr. 4.1 A, str. 50 a tab. 4.1, str. 57).

EcDOS Fe(II)-O₂ se v roztoku vyskytoval ve dvou oligomerních formách – v nejvyšším a středním oligomerním stavu separovaném kolonou, které měly poměr experimentem zjištěné molekulové hmotnosti a teorií vypočtené molekulové hmotnosti přibližně 7 a 2 (vizte hnědá křivka, obr. 4.7, str. 58 a tab. 4.2, str. 58). Lze tedy předpokládat, že střední oligomerní stav je dimerem, ačkoliv byla jeho molekulová hmotnost opět mírně nadhodnocena (vizte tab. 4.2). Na základě tohoto pozorování se můžeme domnívat, že došlo k nadhodnocení také experimentem zjištěné molekulové hmotnosti nejvyššího oligomerního stavu, který tak pravděpodobně odpovídal tetrameru. Vyšší zdánlivá molekulová hmotnost by mohla být způsobena extendovaným tvarem *EcDOS*, jak již bylo zmíněno výše.

EcDOS His77Ala se v roztoku vyskytoval v jediném oligomerním stavu – v nejvyšším oligomerním stavu separovaném kolonou, který by dle poměru experimentem zjištěné molekulové hmotnosti a teorií vypočtené molekulové hmotnosti byl heptamerem (vizte černá křivka, obr. 4.8, str. 59 a tab. 4.3, str. 60). Vzhledem k velice podobnému elučnímu objemu této formy proteinu jako u zřejmě tetramerní formy *EcDOS* Fe(III) a *EcDOS* Fe(II)-O₂ (vizte výše) se můžeme domnívat, že i v případě *EcDOS* His77Ala byla experimentem zjištěná molekulová hmotnost nadhodnocena a tento protein pravděpodobně vytváří v roztoku tetramery. Podobných výsledků bylo dosaženo také při purifikaci proteinu *EcDOS* His77Ala (vizte šedá křivka, obr. 4.8, str. 59 a také vizte obr. 4.1 B, str. 50, vizte tab. 4.3, str. 60).

V literatuře byl *EcDOS* His77Ala (apofорма *EcDOS*) charakterizován jako tetramer [84], což odpovídá našemu pozorování (vizte výše). *EcDOS* Fe(III) se podle dvou různých studií v roztoku vyskytuje buď pouze ve formě tetrameru [84], nebo jen ve formě dimeru [92]. Na základě experimentů provedených v této práci je pravděpodobné, že v případě *EcDOS* Fe(III) se ustavuje rovnováha mezi tetramerem a dimerem, kdy se zastoupení těchto oligomerních stavů liší v závislosti na předchozí inkubaci a přípravě proteinového preparátu. Například teplotní šok má na poměr zastoupení obou

oligomerních forem zásadní vliv. Výše uvedené pozorování by mohlo vysvětlit nesrovnalost v literatuře [84,92]. Protein *EcDOS* Fe(II)-O₂ byl, podobně jako *EcDOS* Fe(III), v roztoku přítomen nejspíše ve formě tetrameru a dimeru (vizte výše). Tato podobnost by mohla být zapříčiněna tím, že byl analyzován *EcDOS* Fe(II)-O₂ znečištěný formou *EcDOS* Fe(III). Během přípravy *EcDOS* ve formě Fe(II)-O₂ a analýzy gelovou permeační chromatografií totiž mohlo dojít k částečné autooxidaci *EcDOS* Fe(II)-O₂ na *EcDOS* Fe(III). Rychlostní konstanta autooxidace *EcDOS* je při 25 °C přibližně 0,015 min⁻¹ [96], což je poměrně vysoká hodnota. *EcDOS* Fe(II)-O₂ má poločas života přibližně 1 hodinu [44,108].

Jelikož vytvoření vyšší oligomerní formy (dimerní nebo tetramerní) proteinu *EcDOS* je nezbytným předpokladem pro jeho fosfodiesterasovou aktivitu [84,85], byl dále analyzován vliv substrátu c-di-GMP na oligomerní stav proteinů *EcDOS* Fe(III), *EcDOS* Fe(II)-O₂ a *EcDOS* His77Ala (vizte kap. 4.5.4). Z těchto tří forem je dle dostupných informací v literatuře *EcDOS* Fe(III) nejméně aktivní [44,91], zatímco *EcDOS* His77Ala a *EcDOS* Fe(II)-O₂ jsou podobně aktivní a vykazují vyšší katalytickou aktivitu než *EcDOS* Fe(III) [91]. U *EcDOS* His77Ala (vizte obr. 4.11, str. 62 a tab. 4.4, str. 62) nedošlo vlivem c-di-GMP ke změně oligomerního stavu (tj. v absenci i přítomnosti substrátu tvoří tento protein v roztoku stále tetramer). V případě *EcDOS* Fe(III) (vizte obr. 4.9, str. 61, tab. 4.4, str. 62) a *EcDOS* Fe(II)-O₂ (vizte obr. 4.10, str. 61 a tab. 4.4) se v přítomnosti c-di-GMP snížilo zastoupení dimerní formy, zatímco obsah tetramerní formy se nezměnil, nebo mírně zvýšil. Dle literatury se tedy vzhledem k aktivitě jednotlivých forem proteinů (vizte výše) zdá, že pro katalýzu by mohla být důležitá spíše tetramerní forma než forma dimerní. V případě aktivnější formy *EcDOS* Fe(II)-O₂ [91] pozorujeme nižší zastoupení dimeru a vyšší zastoupení tetrameru než u méně aktivní formy *EcDOS* Fe(III) [91]. Předpokládáme tedy, že v případě *EcDOS* Fe(II)-O₂ na základě jeho aktivity dle literatury [91] by měla převažovat tetramerní forma a přítomnost dimerní formy si vysvětlujeme kontaminací formy *EcDOS* Fe(II)-O₂ formou *EcDOS* Fe(III) v důsledku náchylnosti Fe(II)-O₂ formy *EcDOS* k rychlé autooxidaci [44,96,108]. Navíc, jak již bylo zmíněno výše, v případě „nezamraženého“ preparátu *EcDOS* Fe(III) převažuje dimerní forma (vizte šedá křivka, obr. 4.1 A, str. 50 a 4.6 A, str. 56). Přítomnost hemu pravděpodobně zvyšuje zastoupení dimerní formy v případě *EcDOS* Fe(III) a snižuje enzymovou aktivitu tohoto proteinu ve srovnání s apoformou, *EcDOS* His77Ala, která byla přítomna pouze ve formě tetrameru. Vazba kyslíku na iont železa hemu holofory *EcDOS* by pak způsobila opětovný nárůst zastoupení tetrameru a zvýšila

katalytickou aktivitu této formy proteinu. V přítomnosti c-di-GMP se v případě *EcDOS* Fe(III) navíc na chromatogramu (vizte obr. 4.9, str. 61 a tab. 4.4, str. 62) objevila forma v nejnižším oligomerním stavu separovaném kolonou. Dle kalibrace kolony (vizte vztah 4.1, str. 54) se jednalo pravděpodobně o monomer. To je poměrně neobvyklé, ale monomerní forma se objevuje také v případě jiných hemových senzorů kyslíku (například diguanylátcyklasy *BpeGReg* z *Bordetella pertusis*) [109]. Závěrem této části práce je možné konstatovat, že oligomerní stav *EcDOS* má bezesporu vliv na enzymovou aktivitu tohoto senzoru. Pro hlubší pochopení všech souvislostí však budou potřeba další experimenty zaměřené na odhalení enzymové aktivity jednotlivých oligomerních stavů v jejich izolované podobě.

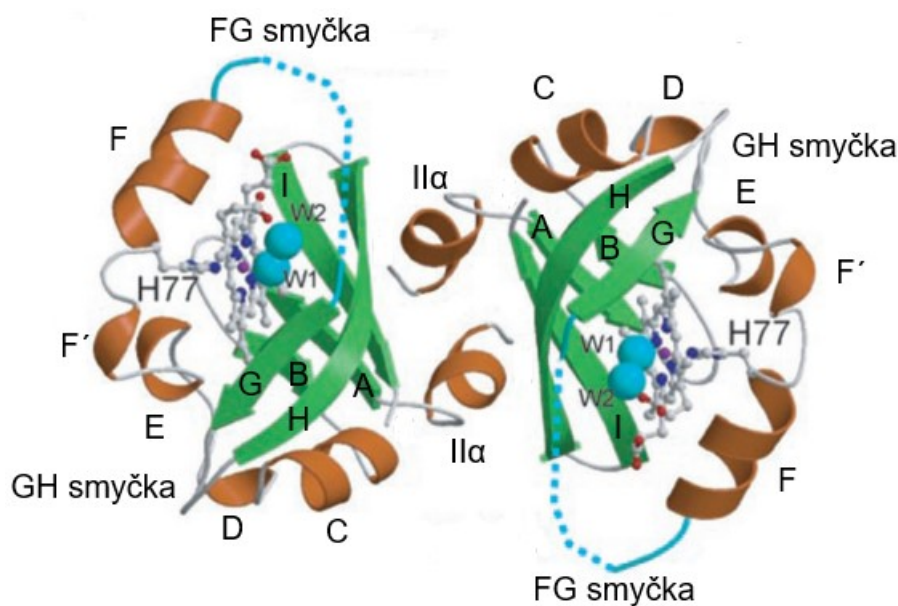
Strukturní dynamika *EcDOS* Fe(III), *EcDOS* Fe(II)-O₂ a *EcDOS* His77Ala byla studována pomocí HDX-MS. Jedním z důvodů, proč byla zvolena právě tato technika, je její úspěšná aplikace v případě GCS *AfGcHK*, kdy v kombinaci s vyřešenou krystalovou strukturou izolovaných domén tohoto hemoproteinu přispěla k objasnění mechanismu přenosu signálu [65,99]. Ani v případě *EcDOS* není známa krystalová struktura plnodélkového proteinu [87], a zatím byly vyřešeny pouze krystalové struktury dvou jeho izolovaných domén, PAS-A domény [85,86] a EAL domény [90], které však neposkytují veškeré důležité informace ohledně vlivu domén na sebe navzájem. Analýza strukturní dynamiky plnodélkové formy *EcDOS* by měla umožnit sledovat změny napříč celým hemoproteinem [110] a napomoci tak k objasnění mechanismu přenosu signálu jednotlivými doménami.

V následujících odstavcích budou diskutovány výsledky HDX-MS analýzy méně aktivní formy *EcDOS* Fe(III) [44,91] a aktivnějších forem *EcDOS* Fe(II)-O₂ a *EcDOS* His77Ala [91] (vizte kap. 4.6.2–4.6.7) navzájem mezi sebou a také propojeny s informacemi dostupnými z krystalových struktur PAS-A domény [85,86] a EAL domény [90]. Výsledky HDX-MS analýzy *EcDOS* Fe(III), *EcDOS* Fe(II)-O₂ a *EcDOS* His77Ala (vizte obr. 4.13 na str. 68, obr. 4.14 na str. 70 a obr. 4.15 na str. 72) vykazovaly obdobný trend. Úroveň deuterace ve většině částí *EcDOS* His77Ala byla v nejkratším inkubačním čase vyšší ve srovnání s deuterací *EcDOS* Fe(III) a *EcDOS* Fe(II)-O₂, což indikuje oblasti více přístupné rozpouštědлу, které jsou pravděpodobně méně strukturované nebo nejsou stericky chráněny jinými částmi proteinu *EcDOS* His77Ala. V rozmezí 20 sekund a 2 hodin HDX reakce se deuterace postupně zvyšovala ve většině částí *EcDOS* Fe(III), *EcDOS* His77Ala a *EcDOS* Fe(II)-O₂. Z toho vyplývá, že jsou tyto části poměrně dobře strukturované (vizte níže). Úroveň deuterace proteinů *EcDOS*

Fe(III), *EcDOS* Fe(II)-O₂ a *EcDOS* His77Ala v nejdelším inkubačním intervalu (2 hodiny) se pohybovala až kolem 60 % potenciálně vyměnitelných atomů vodíku za deuterium. Můžeme se tedy domnívat, že tyto proteiny jsou většinou poměrně dobře přístupné rozpouštědлу a zaujímají méně kompaktní uspořádání v prostoru. To je v souladu s představou, že hemové sensorové proteiny mají poměrně flexibilní strukturu [44].

Zvolené číslování aminokyselinové sekvence *EcDOS* vychází z publikovaných krystalových struktur PAS-A domény [85,86] a oproti sekvenci tohoto proteinu uvedené v databázi Uniprot [87] je v sekvenci konstruktů navíc osm aminokyselin, které jsou umístěny na jeho N-konci. PAS-A (senzorová) doména *EcDOS* (aminokyseliny 1–139) je složena z pěti β -skládaných listů (A, B, G, H, I) a šesti α -helixů (II α , C, D, E, F, F') [85]. N-terminální část proteinu (aminokyseliny 10–22) vykazovala vysokou úroveň deuterace beze změny v čase, což značí rozpouštědлу velmi dobře přístupnou oblast bez definovaného prostorového uspořádání. To je ve shodě s krystalografickými studiemi [85,86]. Na obrázku 5.1 (str. 87) zachycujícím dimer izolované PAS-A domény *EcDOS* Fe(III) je patrné, že helix II α (21–28) vytváří interakční rozhraní mezi PAS-A doménami a nachází se u povrchu proteinu [85]. Tomu odpovídají také výsledky HDX-MS analýzy obou holoforem *EcDOS* i *EcDOS* His77Ala, kde tento helix vykazuje poměrně vysokou míru deuterovanosti a jeho začátek je o něco solventu exponovanější než jeho konec. Kinetika výměny vodíků za deuteria v tomto helixu značí oproti N-konci určitou míru strukturovanosti. Tyto části PAS-A domény (10–32) jsou v čase 20 sekund a 20 minut přístupnější rozpouštědлу (rozdíl v úrovni deuterace až 5,5 %) v případě *EcDOS* Fe(III) ve srovnání s *EcDOS* Fe(II)-O₂ (vizte obr. 4.16, str. 74). Je možné, že tento rozdíl naznačuje důležitost této oblasti pro přenos signálu *EcDOS* z domény sensorové do domény funkční. Regiony zahrnující aminokyseliny 34–66 (β -struktury A a B, helixy C a D, a první část helixu E) a aminokyseliny 102–112 (smyčka GH a první část β -skládaného listu H) jsou méně rozpouštědлу dostupné části PAS-A domén *EcDOS* Fe(III) a *EcDOS* Fe(II)-O₂. Vzhledem k nižší deuteraci β -struktur A a B (okolo 10 % v čase 20 sekund) se můžeme domnívat, že jsou tyto struktury pravděpodobně chráněny jinými částmi domény a mohou být součástí centra domény. To je v souladu s krystalografickou studií [85]. S rostoucí délkou inkubace v sekvencích 34–66 a 102–112 je možné pozorovat postupný nárůst úrovně deuterace, což poukazuje na strukturovanost této oblasti, kdy jsou vodíky proteinové páteře hůře dostupné pro rozpouštědlo vzhledem k jejich zapojení při tvorbě elementů sekundární struktury.

Oblasti PAS-A domény *EcDOS* Fe(III) a *EcDOS* Fe(II)-O₂, které jsou po 20 sekundách reakce více přístupné rozpouštědlu a z jejichž kinetiky výměny vodíků za deuteria v čase je rovněž patrná přítomnost sekundární struktury, zahrnují aminokyseliny 67–102 (druhá část helixu E, helixy F' a F, FG smyčka, β-struktura G) a aminokyseliny 113–132 (druhá část β-skládaného listu H a β-struktura I, smyčka HI) [85]. Jelikož tyto oblasti vykazují střední úroveň deuterace v PAS-A doméně, lze předpokládat, že budou blíže k povrchu domény, ale zároveň částečně chráněny před přístupem rozpouštědla jinými částmi domény nebo molekulou hemu. To je ve shodě s krystalovou strukturou na obrázku 5.1 (str. 87). Helix F tvoří proximální stranu hemu a β-skládané listy G a H tvoří distální stranu hemu [86]. Součástí FG smyčky je také Arg97, který v případě *EcDOS* Fe(II)-O₂ vytváří vodíkovou vazbu s molekulou kyslíku [95]. Spolu s helixem II α se β-skládané listy H a I účastní interakčního rozhraní mezi PAS-A doménami [85,86]. Smyčky FG a HI, a také β-struktury G, H a I se pravděpodobně prostřednictvím změny své struktury nebo přeuspořádáním vodíkových vazeb v závislosti na oxidačně-redukčním a ligandovém stavu iontu železa podílí na přenosu signálu z okolí hemu do dalších částí proteinu [85,86]. Prostřední část PAS-A domény *EcDOS* His77Ala (33–112) zahrnující β-skládané listy A, B, G a H (začátek) a helixy B, C, D, E, F a F' je oproti PAS-A doménám *EcDOS* Fe(III) a *EcDOS* Fe(II)-O₂ v časových intervalech 20 sekund i 20 minut deprotektovaná (vizte obr. 4.17, str. 76 a 4.18, str. 78). To bylo možné očekávat, jelikož s *EcDOS* His77Ala není asociována molekula hemu (chybí proximální ligand His77), která tak nechrání prostřední část PAS-A domény před přístupem rozpouštědla. Vzhledem k postupnému nárůstu úrovně deuterace prostřední části PAS-A domény s časem se můžeme domnívat, že tato část bude strukturovaná. Spojení PAS-A a PAS-B domény v případě obou holoforem proteinu *EcDOS* i proteinu *EcDOS* His77Ala je po 2 hodinách jednou z nejvíce rozpouštědlu přístupnou částí jejich PAS-A domén, která vykazuje určitou míru strukturovanosti.



Obrázek 5.1: Struktura dimeru PAS-A domény *EcDOS* Fe(III). Tato doména je složena z pěti β -skládaných listů (A, B, G, H, I) a šesti α -helixů (II α , C, D, E, F, F'). Molekula hemu je vyobrazena bílou barvou v tyčinkovém modelu. Proximální axiálním ligandem iontu železa hemu je His77 (H77) a distálním molekulou vody (W1), která interaguje s jinou molekulou vody (W2). Převzato z [85] (kód v PDB databázi 1V9Y) a upraveno.

Nejméně rozpouštědly dostupné části PAS-B domény (141–256 [83]) po 20sekundové HDX reakci v případě *EcDOS* Fe(III), *EcDOS* Fe(II)-O₂ a *EcDOS* His77A1a zahrnovaly aminokyseliny 150–161 (pro obě holofomy *EcDOS* 150–176), 230–233 a 244–249, které by mohly být chráněny před přístupem rozpouštědla jinými částmi domény nebo jsou vzhledem k jejich kinetice výměny vodíků za deuteria zapojeny do tvorby sekundárních, respektive terciárních strukturních motivů. Méně chráněné části PAS-B domény v čase 20 sekund, které však stále vykazují určitou míru strukturovanosti, zahrnují sekvence 177–183 (v případě *EcDOS* His77A1a 162–182), 207–229, 234–243 a 250–255. Tyto části jsou tak pravděpodobně blíže povrchu PAS-B domény. Nejvíce rozpouštědly přístupný úsek PAS-B domény zahrnuje aminokyseliny 183–206 a je nejspíše vzhledem k nižšímu nárůstu úrovně deuterace v čase méně strukturovaný. Předpokládá se, že PAS-B doména částečně přispívá (spolu s helixem II α a β -skládanými listy H a I v doméně PAS-A [85,86], vizte diskuse výše) k tvorbě oligomerů [83]. To by mohlo být zprostředkováno regiony PAS-B domény, které vykazují nejnižší nebo nižší úroveň deuterace a v jejichž případě by byl přístup rozpouštědla stericky omezen například částmi jiné interagující PAS-B domény.

Oblast mezi PAS-B a GGDEF doménami (257–409 [87]) vykazovala oproti PAS-A a PAS-B doménám vyšší úroveň deuterace již v nejkratším inkubačním intervalu (úroveň

deuterace více než 20 %), což naznačuje její méně kompaktní uspořádání oproti těmto doménám. Části této oblasti po 20 sekundách HDX reakce méně chráněné před přístupem rozpouštědla (266–270, 295–320, 356–368 a 384–407, v případě *EcDOS His77Ala* 405–408) a více chráněné před přístupem rozpouštědla (266–270, 295–320, 356–368 a 384–407, v případě *EcDOS His77Ala* 405–408) jsou většinou totožné pro *EcDOS Fe(III)*, *EcDOS Fe(II)-O₂* a *EcDOS His77Ala* (podobně jako u PAS-B domény). Největší rozdíl v úrovni deuterace *EcDOS His77Ala* oproti *EcDOS Fe(III)* (až + 15 %) v této části proteinu byl po 20sekundové HDX reakci zaznamenán v regionu zahrnujícím aminokyseliny 384–407 a oproti *EcDOS Fe(II)-O₂* (až + 15 %) byl v regionu zahrnujícím aminokyseliny 384–415. Tento region je tedy v případě *EcDOS His77Ala* přístupnější rozpouštědlu a mohl by mít význam při intermolekulárním přenosu signálu (místo, které je ovlivněno primárním signálem v sensorové doméně). Na základě kinetiky výměny vodíků za deuteria jsou méně strukturované z oblasti mezi PAS-B a GGDEF doménami sekvence 302–322, 346–354 a 375–382 (pro *EcDOS His77Ala* 375–383).

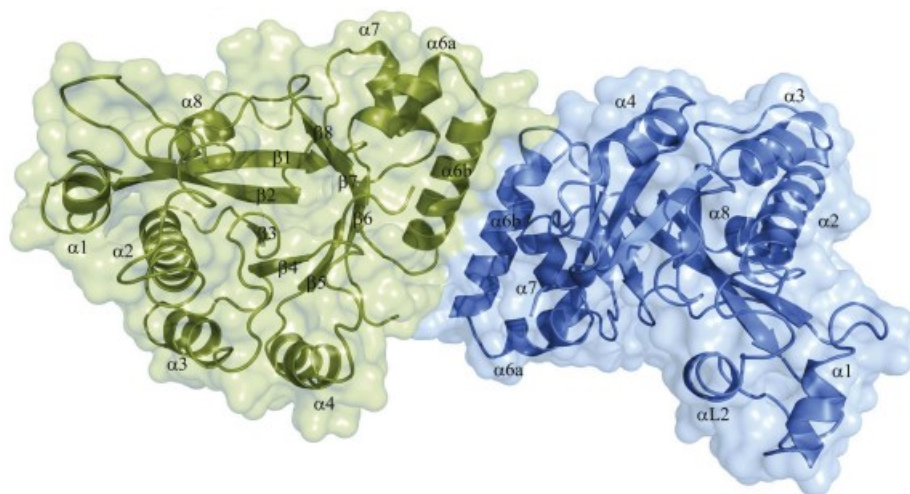
Po 20 sekundách HDX reakce jsou nejméně rozpouštědlu dostupnými částmi katalyticky neaktivní [44,83] GGDEF domény (410–540 [87]) *EcDOS Fe(III)* a *EcDOS Fe(II)-O₂* regiony zahrnující aminokyseliny 408–415, 439–455 a 492–504, přičemž deuterace posledního zmíněného regionu se po 2 hodinách zvyšuje o 43–45 %. V tomto regionu by tedy mohlo docházet k pomalé konformační změně významného rozsahu, která by se opět mohla uplatnit v procesu přenosu signálu mezi doménou sensorovou (PAS-A) a doménou funkční (EAL doména, vizte dále). V případě *EcDOS His77Ala* jsou nejméně rozpouštědlu dostupnými částmi GGDEF domény sekvence 439–454 a 502–504. Tyto nejméně rozpouštědlu dostupné oblasti by mohly být součástí jádra GGDEF domény. Prostřední úroveň deuterace GGDEF domény vykazují v případě holoforem *EcDOS* úseky obsahující aminokyseliny 416–438, 456–465, 472–491 a 514–537 a pro *EcDOS His77Ala* úseky 409–438, 455–465 a 491–501, 515–525. Tyto úseky jsou méně chráněné před přístupem rozpouštědla a pravděpodobně jsou situovány blíže povrchu domény. Nejvíce deuterované části GGDEF domény, které jsou tedy nejvíce přístupné rozpouštědlu a pravděpodobně jsou přítomny blíže povrchu domény, jsou pro holofory i apoformu *EcDOS* regiony zahrnující aminokyseliny 466–471, 505–513 a 538–552. V případě *EcDOS His77Ala* jsou to ještě sekvence 472–491 a 526–537. Vzhledem k postupnému nárůstu úrovně deuterace GGDEF domény v čase lze říci, že je tato doména poměrně dobře strukturovaná jako PAS-A a PAS-B domény. Poněkud méně strukturovaný je vzhledem k jeho kinetice výměny vodíků za deuteria region

zahrnující aminokyseliny 537–544 a v případě *EcDOS His77Ala* ještě sekvence 505–514. Výraznější rozdíly v úrovni deuterace se projevily zejména v případě *EcDOS His77Ala* (vyšší deuterace) oproti *EcDOS Fe(III)* a *EcDOS Fe(II)-O₂* (nižší deuterace) v sekvencích 439–448, 472–504 a 515–537 po 20sekundové HDX reakci a v sekvenci 439–448 po 20minutové HDX reakci. V případě *EcDOS His77Ala* jsou tedy tyto oblasti tedy méně chráněné před přístupem rozpouštědla. Naopak nižší míru deuterace této domény po 20 minutách v případě proteinu *EcDOS His77Ala* oproti *EcDOS Fe(III)* a *EcDOS Fe(II)-O₂* vykazovala sekvence 424–430, které byla tedy méně přístupná rozpouštědлу. Nižší rozdíly mezi výsledky HDX-MS analýzy *EcDOS Fe(III)* a *EcDOS Fe(II)-O₂* oproti apoformě *EcDOS* by mohly být způsobeny částečnou autooxidací *EcDOS Fe(II)-O₂* na *EcDOS Fe(III)* [44,96,108].

Funkční doména proteinu *EcDOS*, EAL doména, vykazující fosfodiesterasovou aktivitu [44,83], tj. úsek zahrnující aminokyseliny 549–803 [87], je složena z osmi α -helixů (α 1– α 8), pěti smyček (L1–L5) a osmi β -skládaných listů (β 1– β 8) a je uspořádána do tvaru β -barelu [90]. Vzhledem k nižší úrovni deuterace EAL domény v čase 20 sekund oproti ostatním částem proteinu tato doména nejspíše zaujímá o něco kompaktnější uspořádání. Nejméně rozpouštědлу přístupnou částí domény ve všech časových intervalech, které jsou společné všem třem studovaným formám *EcDOS*, byla prostřední část helixu α 2 (622–627 [90]). Tento prvek sekundární struktury se pravděpodobně nachází hlouběji ve struktuře domény, což je ve shodě se strukturou dimeru izolované EAL domény (vizte obr. 5.2, str. 91). Nízkou deuteraci po 20 sekundách, která po dvou hodinách narostla až o 45 %, vykazovaly také konec helixu α L2 a smyčka L2 (602–608) situované mezi β -strukturou β 2 a helixem α 2 [90]. V této oblasti tak s vysokou pravděpodobností dochází k pomalé, ale významné konformační změně do otevřenějšího uspořádání. Tato oblast by tak mohla být důležitá pro příjem signálu ze sensorové domény. L2, α L2 a α 1 vytváří lalok na okraji horní části barelu [90]. Helix α 1 (551–558 [90]) je poměrně dobře exponovaný solventu již v nejkratším časovém intervalu, přičemž úroveň deuterace v jeho první části je vyšší než v části druhé. Druhá část tohoto helixu je tedy více chráněna před přístupem rozpouštědla. To je v souladu s výsledky krystalografické studie [90], podle níž by měly β -skládané listy β 1 (565–574) a β 2 (580–591) vytvářet stěnu barelu (vizte obr. 5.2, str. 91), což odpovídá úrovni jejich deuterace po 20 sekundách v případě *EcDOS Fe(III)* a *EcDOS Fe(II)-O₂*. Pro *EcDOS His77Ala* je deuterace těchto vláken o více než 10 % vyšší, což indikuje rozpouštědлу dostupnější strukturu nebo rozvolnění tohoto strukturního prvku do flexibilnější podoby.

Tento rozdíl by mohl být důležitý také při katalýze, jelikož součástí β -struktury $\beta 2$ je EAL motiv (Glu584–Ala–Leu586). Glu584 a Leu586 vytváří spodní část vazebného místa pro substrát a postranní řetězec Ala585 je umístěn uvnitř domény. Postranní řetězec aminokyseliny Arg588, která se rovněž nachází v β -skládaném listu $\beta 2$, interaguje s druhým fosfátem substrátu c-di-GMP [90]. To by mohlo značit, že v případě *EcDOS* His77Ala je vazebné místo pro substrát přístupnější než v případě holoformem *EcDOS*. Avšak v případě β -struktury $\beta 3$ (640–643), jejíž součástí je Asn643 interagující s prvním fosfátem substrátu c-di-GMP [90], nebyly zaznamenány významnější rozdíly mezi *EcDOS* a *EcDOS* His77Ala. Tato β -struktura je v nejkratším časovém intervalu rozpouštědla málo přístupná. Za $\beta 3$ následuje smyčka L3 (644–655), jejíž část (Ala646 a Leu647) v neaktivní konformaci *EcDOS* brání přístupu substrátu do aktivního místa [90]. Dle HDX-MS dat je i tato smyčka rozpouštědla přístupnější v případě *EcDOS* His77Ala (v čase 20 sekund o cca 7 % vyšší úroveň deuterace) oproti *EcDOS* Fe(III) a *EcDOS* Fe(II)-O₂. Je tedy možné, že smyčka L3 *EcDOS* His77Ala tolik stericky neomezuje aktivní místo a umožňuje vazbu substrátu na tuto formu proteinu *EcDOS*. Vzhledem k nižšímu rozdílu deuterace (přibližně 2 %) mezi holoformami *EcDOS* nelze spekulovat o významu tohoto deuterančního rozdílu pro katalýzu. Na druhou stranu je ale i na tomto místě nutné připomenout výše detailně provedenou diskusi o tom, že míra autooxidace *EcDOS* Fe(II)-O₂ je vysoká a během experimentu pravděpodobně došlo k postupné přeměně formy Fe(II)-O₂ zpět na formu Fe(III), a tudíž je logické, že za těchto experimentálních podmínek nebyl pozorován větší rozdíl. Následujícími částmi EAL domény jsou $\alpha 3$ (655–665), $\beta 4$ (672–676), L4, $\alpha 4$ (687–697) a $\beta 5$ (701–704) [90]. Dle HDX-MS dat se jedná o strukturované oblasti s výjimkou smyčky L4, jejíž kinetika výměny značí nestrukturovanou oblast. To odpovídá datům z krystalografické studie [90]. Smyčka L5 (705–710) a helix $\alpha 5$ (711–715) [90] jsou více solventu exponované části EAL domény, které jsou pravděpodobně méně strukturované. Neuspořádanost helixu $\alpha 5$ byla navržena také v krystalografické studii [90]. Následují $\beta 6$ (724–727), $\alpha 6a$ (728–736) a $\alpha 6b$ (740–755) [90], které jsou strukturované a méně rozpouštědla přístupné v čase 20 sekund. Helix $\alpha 5$ spolu s helixem $\alpha 6b$ vytváří interakční rozhraní EAL domén [90], což by mohlo vysvětlovat o něco nižší deuteraci helixu $\alpha 6b$, který je pravděpodobně chráněn před přístupem rozpouštědla jinými částmi interagující EAL domény. Vyšší změna úrovně deuterace v čase pak naznačuje méně kompaktní interakční rozhraní mezi doménami. To neodporuje myšlence autorů krystalografické studie, kteří navrhli, že z PAS-A domény by se signál mohl přenášet přes interakční rozhraní EAL domén tvořené

$\alpha 5$ a $\alpha 6b$, což by vedlo ke konformačním změnám L3 a L5 a umožnilo vazbu substrátu do aktivního místa a vazbu kofaktorů *EcDOS*, dvou dvojmocných iontů kovů, které jsou koordinovány Asp705 a Asp706 ze smyčky L5 [90]. Dle obrázku 5.2 β -skládané listy $\beta 7$ (758–762) a $\beta 8$ (780–782) vytváří stěny barelu a helixy $\alpha 7$ (766–776) a $\alpha 8$ (794–802) stěny barelu ohraničují zvenku [90]. Na základě HDX-MS dat jsou tyto β -struktury a helix $\alpha 7$ oblastmi méně rozpouštědly přístupnými a helix $\alpha 8$ je více rozpouštědly přístupnou oblastí. Helix $\alpha 7$ je dle obrázku 5.2 před přístupem rozpouštědla chráněn helixy $\alpha 6a$ a $\alpha 6b$ [90]. Výše popsané výsledky HDX-MS analýzy většinou odpovídají informacím dostupným z krystalografických struktur PAS-A domény [85] a EAL domény [90].



Obrázek 5.2: Struktura dimeru EAL domény *EcDOS*. Tato doména je složena z osmi α -helixů ($\alpha 1$ – $\alpha 8$) a osmi β -skládaných listů ($\beta 1$ – $\beta 8$). Převzato z [90] (kód v PDB databázi 4HU4 [87]).

V závěru diskuse je možné konstatovat, že na základě výsledků oligomerních a konformačních analýz se zdá, že všechny tři studované formy *EcDOS* mají protáhlý tvar a zaujímají v roztoku méně kompaktní uspořádání ve srovnání s globulárními proteiny podobné molekulové hmotnosti. Dále bylo zjištěno, jak uskladnění a následné temperování preparátů proteinů *EcDOS* Fe(III) a *EcDOS* His77Ala ovlivňuje zastoupení jejich oligomerních stavů, což by mohlo objasnit nesrovnalosti, které o oligomerním stavu *EcDOS* Fe(III) v literatuře [84,92] panují. Vystávají nové vědecké otázky ohledně souvislostí mezi oligomerními stavy jednotlivých proteinů *EcDOS* a jejich enzymovými aktivitami, na které by bylo vhodné se zaměřit v dalších studiích. Největší rozdíly v oligomerních stavech a strukturní dynamice byly pozorovány mezi apoformou a holoformami *EcDOS*, v jejichž případě nevidíme velké rozdíly mezi formou *EcDOS*

Fe(III) a Fe(II)-O₂. Pro další experimenty by bylo vhodné zvolit lepší (méně časově náročnou) metodu pro jak oligomerní, tak konformační analýzu formy *EcDOS* Fe(II)-O₂, aby nedocházelo k její autooxidaci a následné kontaminaci formou *EcDOS* Fe(III). Pomocí metody HDX-MS byly naznačeny části proteinu *EcDOS*, kde dochází ke konformačním změnám při přechodu do různých oxidativně-redukčních, respektive ligandových stavů iontu železa hemu, což by mohlo přispět k odhalení mechanismu přenosu signálu ze sensorové do funkční domény.

6 Závěr

Tato diplomová práce se zaměřuje na kyslíkový senzor *EcDOS* a jeho apoformu *EcDOS His77Ala*. Vytyčené cíle diplomové práce byly splněny s následujícími výsledky:

- Dosavadní poznatky z odborné literatury ohledně hemových sensorových proteinů jsou sumarizovány na stranách 13–30.
- Proteiny *EcDOS* a *EcDOS His77Ala* byly úspěšně rekombinantně exprimovány a následně izolovány. Hmotnostní koncentrace proteinu *EcDOS* v roztoku o celkovém objemu 240 μl činila $4,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a hmotnostní koncentrace *EcDOS His77Ala* v 260 μl roztoku $3,3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Z 1 litru TB média bylo získáno 480 μg výsledného preparátu proteinu *EcDOS* a v případě *EcDOS His77Ala* bylo z 1 litru TB média získáno 429 μg preparátu. Výtěžky opakovaných izolací obou proteinů byly téměř shodné.
- Soretův pás *EcDOS Fe(III)* se vyskytoval při 417 nm a Q-pásky α a β při 531 nm a 562 nm. Soretův pás *EcDOS Fe(II)-O₂* se nacházel v oblasti 417 nm a Q-pásky α a β v oblasti 540 nm a 578 nm.
- S využitím UV-VIS spektrofotometrie bylo ověřeno, že *EcDOS His77Ala* molekulu hemu neváže, a je tedy apoformou *EcDOS*.
- Bylo zjištěno, že preparáty proteinu *EcDOS Fe(III)* nebo *EcDOS His77Ala*, které byly skladovány při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, je nutné před dalším experimentem inkubovat alespoň 1,5 hodiny při teplotě $0 \text{ }^\circ\text{C}$.
- *EcDOS Fe(III)* a *EcDOS Fe(II)-O₂* se v roztoku pravděpodobně vyskytovaly ve dvou oligomerních stavech – majoritně v tetramerní formě a v menší míře ve formě dimeru. *EcDOS His77Ala* byl v roztoku přítomen patrně pouze v tetramerní formě. Zatímco přítomnost substrátu tohoto enzymu, c-di-GMP, neměla zásadní vliv na oligomerní stav *EcDOS His77Ala*, v případě *EcDOS Fe(II)-O₂* kleslo zastoupení dimerní formy a obsah tetramerní formy se mírně zvýšil a u *EcDOS Fe(III)* se snížilo zastoupení dimerní formy, zastoupení tetramerní formy se nezměnilo a objevila se minoritní monomerní forma.
- S využitím techniky HDX-MS byla analyzována strukturní dynamika *EcDOS Fe(III)*, *EcDOS Fe(II)-O₂* a *EcDOS His77Ala*. Všechny tyto formy proteinu *EcDOS* se zdají být dobře strukturované a zaujímají v prostoru méně kompaktní uspořádání. Rozdíly v úrovni deuterace mezi dvěma zástupci oxidačně-redukčních

a ligandových stavů iontu železa hemu *EcDOS* (tj. Fe(III) a Fe(II)-O₂) byly nízké. Výraznější byly rozdíly deuterace mezi holoformami a apoformou proteinu *EcDOS*.

- V sensorové (PAS-A) doméně se zdá být důležitou pro vznik signálu oblast zahrnující aminokyseliny 10–32 a 86–132 a ve funkční (EAL) doméně pak pozorujeme výraznější změny v části obsahující aminokyseliny 557–586, 602–608, 645–672, 698–717, 758–769 a 786–799. Je tedy pravděpodobné, že tyto části proteinu *EcDOS* mohou hrát velkou roli v procesu přenosu signálu z domény sensorové do domény funkční.

Seznam použitých zdrojů

- [1] Oohora, K.; Hayashi, T. Hemoprotein-Based Supramolecular Assembling Systems. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2014, 19, 154–161.
- [2] Lu, Y.; Yeung, N.; Sieracki, N.; Marshall, N. M. Design of Functional Metalloproteins. *Nature*, 2009, 460, 855–862.
- [3] Waldron, K. J.; Rutherford, J. C.; Ford, D.; Robinson, N. J. Metalloproteins and Metal Sensing. *Nature*, 2009, 460, 823–830.
- [4] Li, T.; Bonkovsky, H. L.; Guo, J. Structural Analysis of Heme Proteins: Implications for Design and Prediction. *BMC Structural Biology*, 2011, 11, 13.
- [5] Zhang, L. *Heme Biology: The Secret Life of Heme in Regulating Diverse Biological Processes*; World Scientific Publishing Co., Inc.: New Jersey, USA, 2011; p. 213.
- [6] Ponka, P. Cell Biology of Heme. *Am. J. Med. Sci.*, 1999, 318, 241–256.
- [7] *ChemSketch*; Advanced Chemistry Development, Inc.: Toronto, Ontario, Kanada, 2022.
- [8] Fufezan, C.; Zhang, J.; Gunner, M. R. Ligand Preference and Orientation in *B*- and *c*-Type Heme-Binding Proteins. *Proteins*, 2008, 73, 690–704.
- [9] Allen, J. W. A.; Ferguson, S. J. The *Escherichia Coli* Cytochrome *c* Maturation (Ccm) Apparatus Can Mature Cytochromes with an Extra Cysteine within or Adjacent to the CXXCH Motif. *Biochem. Soc. Trans.*, 2006, 34, 91–93.
- [10] Hederstedt, L. Heme A Biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, 2012, 1817, 920–927.
- [11] Girvan, H. M.; Munro, A. W. Heme Sensor Proteins. *J. Biol. Chem.*, 2013, 288, 13194–13203.
- [12] Igarashi, K.; Matsui, M. Wearing Red for Signaling: The Heme-Bach Axis in Heme Metabolism, Oxidative Stress Response and Iron Immunology. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2014, 232, 229–253.
- [13] Hanna, D. A.; Harvey, R. M.; Martinez-Guzman, O.; Yuan, X.; Chandrasekharan, B.; Raju, G.; Outten, F. W.; Hamza, I.; Reddi, A. R. Heme Dynamics and Trafficking Factors Revealed by Genetically Encoded Fluorescent Heme Sensors. *PNAS*, 2016, 113, 7539–7544.
- [14] Kikuchi, G.; Yoshida, T.; Noguchi, M. Heme Oxygenase and Heme Degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, 338, 558–567.
- [15] Knutson, M. D. Iron Transport Proteins: Gateways of Cellular and Systemic Iron Homeostasis. *J. Biol. Chem.*, 2017, 292, 12735–12743.
- [16] Kumar, S.; Bandyopadhyay, U. Free Heme Toxicity and Its Detoxification Systems in Human. *Toxicol. Lett.*, 2005, 157, 175–188.
- [17] Gell, D. A. Structure and Function of Haemoglobins. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2018, 70, 13–42.
- [18] Fukuto, J. M.; Carrington, S. J.; Tantillo, D. J.; Harrison, J. G.; Ignarro, L. J.; Freeman, B. A.; Chen, A.; Wink, D. A. Small Molecule Signaling Agents: The Integrated Chemistry and Biochemistry of Nitrogen Oxides, Oxides of Carbon, Dioxide, Hydrogen Sulfide, and Their Derived Species. *Chem. Res. Toxicol.*, 2012, 25, 769–793.
- [19] Farhana, A.; Saini, V.; Kumar, A.; Lancaster, J. R.; Steyn, A. J. C. Environmental Heme-Based Sensor Proteins: Implications for Understanding Bacterial Pathogenesis. *Antioxid. Redox Signal.*, 2012, 17, 1232–1245.
- [20] Igarashi, J.; Kitanishi, K.; Martínková, M.; Murase, M.; Iizuka, A.; Shimizu, T. The Roles of Thiolate-Heme Proteins, Other Than the P450 Cytochromes, in the Regulation of Heme-Sensor Proteins. *Acta Chim. Slov.*, 2007, 55.

- [21] Ronda, L.; Bruno, S.; Faggiano, S.; Bettati, S.; Mozzarelli, A. Oxygen Binding to Heme Proteins in Solution, Encapsulated in Silica Gels, and in the Crystalline State. *Methods Enzymol.*, 2008, 437, 311–328.
- [22] Poulos, T. L. Heme Enzyme Structure and Function. *Chem. Rev.*, 2014, 114, 3919–3962.
- [23] Singh, B.; Sharma, S.; Singh, B. Antioxidant Enzymes in Cabbage: Variability and Inheritance of Superoxide Dismutase, Peroxidase and Catalase. *Sci. Hortic.*, 2010, 124, 9–13.
- [24] Ramasarma, T.; Vaigundan, D. Alternative Pathway Linked by Hydrogen Bonds Connects Heme-Fe of Cytochrome *c* with Subunit II-CuA of Cytochrome *a*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2018, 505, 445–447.
- [25] Igarashi, J.; Kitanishi, K.; Shimizu, T. 73 Emerging Roles of Heme as a Signal and a Gas-Sensing Site: Heme-Sensing and Gas-Sensing Proteins. In *Handbook of Porphyrin Science*; World Scientific Publishing Company, 2011; 15, 399–460.
- [26] Sousa, E. H. S.; Lopes, L. G. de F.; Gonzalez, G.; Gilles-Gonzalez, M. A. Drug Discovery Targeting Heme-Based Sensors and Their Coupled Activities. *J. Inorg. Biochem.*, 2017, 167, 12–20.
- [27] Gilles-Gonzalez, M. A.; Gonzalez, G. Heme-Based Sensors: Defining Characteristics, Recent Developments, and Regulatory Hypotheses. *J. Inorg. Biochem.*, 2005, 99, 1–22.
- [28] Rivera, S.; Young, P. G.; Hoffer, E. D.; Vansuch, G. E.; Metzler, C. L.; Dunham, C. M.; Weinert, E. E. Structural Insights into Oxygen-Dependent Signal Transduction within Globin Coupled Sensors. *Inorg. Chem.*, 2018, 57, 14386–14395.
- [29] Liebl, U.; Lambry, J. C.; Vos, M. H. Primary Processes in Heme-Based Sensor Proteins. *Biochim. Biophys. Acta – Proteins Proteom.* 2013, 1834, 1684–1692.
- [30] Shimizu, T.; Lengalova, A.; Martínek, V.; Martíňková, M. Heme: Emergent Roles of Heme in Signal Transduction, Functional Regulation and as Catalytic Centres. *Chem. Soc. Rev.*, 2019, 48, 5624–5657.
- [31] Igarashi, J.; Murase, M.; Iizuka, A.; Pichierri, F.; Martíňková, M.; Shimizu, T. Elucidation of the Heme Binding Site of Heme-Regulated Eukaryotic Initiation Factor 2alpha Kinase and the Role of the Regulatory Motif in Heme Sensing by Spectroscopic and Catalytic Studies of Mutant Proteins. *J. Biol. Chem.*, 2008, 283, 18782–18791.
- [32] Watanabe-Matsui, M.; Matsumoto, T.; Matsui, T.; Ikeda-Saito, M.; Muto, A.; Murayama, K.; Igarashi, K. Heme Binds to an Intrinsically Disordered Region of Bach 2 and Alters Its Conformation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2015, 565, 25–31.
- [33] Yang, J.; Ishimori, K.; O'Brian, M. R. Two Heme Binding Sites Are Involved in the Regulated Degradation of the Bacterial Iron Response Regulator (Irr) Protein. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, 7671–7676.
- [34] Zhang, L.; Guarente, L. Heme Binds to a Short Sequence That Serves a Regulatory Function in Diverse Proteins. *EMBO J.*, 1995, 14, 313–320.
- [35] Igarashi, K.; Nishizawa, H.; Saiki, Y.; Matsumoto, M. The Transcription Factor BACH1 at the Crossroads of Cancer Biology: From Epithelial–Mesenchymal Transition to Ferroptosis. *J. Biol. Chem.*, 2021, 297, 101032.
- [36] Pfeifer, K.; Kim, K. S.; Kogan, S.; Guarente, L. Functional Dissection and Sequence of Yeast HAP1 Activator. *Cell*, 1989, 56, 291–301.
- [37] Hickman, M. J.; Winston, F. Heme Levels Switch the Function of Hap1 of *Saccharomyces Cerevisiae* between Transcriptional Activator and Transcriptional Repressor. *Mol. Cell. Biol.*, 2007, 27, 7414–7424.

- [38] Yang, F.; Wang, E. D. Heme Regulates Protein Homeostasis at Transcription, Protein Translation, and Degradation Levels. *Front. Biol.*, 2010, 5, 516–523.
- [39] Mense, S. M.; Zhang, L. Heme: A Versatile Signaling Molecule Controlling the Activities of Diverse Regulators Ranging from Transcription Factors to MAP Kinases. *Cell. Res.*, 2006, 16, 681–692.
- [40] Hach, A.; Hon, T.; Zhang, L. A New Class of Repression Modules Is Critical for Heme Regulation of the Yeast Transcriptional Activator Hap1. *Mol. Cell. Biol.*, 1999, 19, 4324–4333.
- [41] Zhang, L.; Hach, A. Molecular Mechanism of Heme Signaling in Yeast: The Transcriptional Activator Hap1 Serves as the Key Mediator. *Cell. Mol. Life Sci.*, 1999, 56, 415–426.
- [42] Chul Lee, H.; Hon, T.; Lan, C.; Zhang, L. Structural Environment Dictates the Biological Significance of Heme-Responsive Motifs and the Role of Hsp90 in the Activation of the Heme Activator Protein Hap1. *Mol. Cell. Biol.*, 2003, 23, 5857–5866.
- [43] Lee, H. C.; Zhang, L. A Unique Mechanism of Chaperone Action: Heme Regulation of Hap1 Activity Involves Separate Control of Repression and Activation. *Protein Pept. Lett.*, 2009, 16, 642–649.
- [44] Shimizu, T.; Huang, D.; Yan, F.; Stranova, M.; Bartosova, M.; Fojtíková, V.; Martínková, M. Gaseous O₂, NO, and CO in Signal Transduction: Structure and Function Relationships of Heme-Based Gas Sensors and Heme-Redox Sensors. *Chem. Rev.*, 2015, 115, 6491–6533.
- [45] Uchida, T.; Sato, E.; Sato, A.; Sagami, I.; Shimizu, T.; Kitagawa, T. CO-Dependent Activity-Controlling Mechanism of Heme-Containing CO-Sensor Protein, Neuronal PAS Domain Protein 2. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, 21358–21368.
- [46] Fonseca, B. M.; Paquete, C. M.; Louro, R. O. Molecular Mechanisms of Heme Based Sensors from Sediment Organisms Capable of Extracellular Electron Transfer. *J. Inorg. Biochem.*, 2014, 133, 104–109.
- [47] Moskvina, O. V.; Kaplan, S.; Gilles-Gonzalez, M. A.; Gomelsky, M. Novel Heme-Based Oxygen Sensor with a Revealing Evolutionary History. *J. Biol. Chem.*, 2007, 282, 28740–28748.
- [48] Gullotta, F.; di Masi, A.; Coletta, M.; Ascenzi, P. CO Metabolism, Sensing, and Signaling. *Biofactors*, 2012, 38, 1–13.
- [49] Oelgeschläger, E.; Rother, M. Carbon Monoxide-Dependent Energy Metabolism in Anaerobic Bacteria and Archaea. *Arch. Microbiol.*, 2008, 190, 257–269.
- [50] Banerjee, R.; Zou, C. G. Redox Regulation and Reaction Mechanism of Human Cystathionine-Beta-Synthase: A PLP-Dependent Hemesensor Protein. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2005, 433, 144–156.
- [51] Marletta, M. A. Nitric Oxide Synthase: Aspects Concerning Structure and Catalysis. *Cell*, 1994, 78, 927–930.
- [52] Hill, B. G.; Dranka, B. P.; Bailey, S. M.; Lancaster, J. R.; Darley-Usmar, V. M. What Part of NO Don't You Understand? Some Answers to the Cardinal Questions in Nitric Oxide Biology. *J. Biol. Chem.*, 2010, 285, 19699–19704.
- [53] Montfort, W. R.; Wales, J. A.; Weichsel, A. Structure and Activation of Soluble Guanylyl Cyclase, the Nitric Oxide Sensor. *Antioxid. Redox Signal.*, 2017, 26, 107–121.
- [54] Sandner, P.; Zimmer, D. P.; Milne, G. T.; Follmann, M.; Hobbs, A.; Stasch, J. P. Soluble Guanylate Cyclase Stimulators and Activators. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2021, 264, 355–394.

- [55] Lee, Y. C.; Martin, E.; Murad, F. Human Recombinant Soluble Guanylyl Cyclase: Expression, Purification, and Regulation. *PNAS*, 2000, 97, 10763–10768.
- [56] Zhao, Y.; Hoganson, C.; Babcock, G. T.; Marletta, M. A. Structural Changes in the Heme Proximal Pocket Induced by Nitric Oxide Binding to Soluble Guanylate Cyclase. *Biochemistry*, 1998, 37, 12458–12464.
- [57] Taylor, B. L.; Zhulin, I. B. PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1999, 63, 479–506.
- [58] Heikaus, C. C.; Pandit, J.; Klevit, R. E. Cyclic Nucleotide Binding GAF Domains from Phosphodiesterases: Structural and Mechanistic Insights. *Structure*, 2009, 17, 1551–1557.
- [59] Martínková, M.; Kitanishi, K.; Shimizu, T. Heme-Based Globin-Coupled Oxygen Sensors: Linking Oxygen Binding to Functional Regulation of Diguanylate Cyclase, Histidine Kinase, and Methyl-Accepting Chemotaxis. *J. Biol. Chem.*, 2013, 288, 27702–27711.
- [60] Sawai, H.; Yoshioka, S.; Uchida, T.; Hyodo, M.; Hayakawa, Y.; Ishimori, K.; Aono, S. Molecular Oxygen Regulates the Enzymatic Activity of a Heme-Containing Diguanylate Cyclase (HemDGC) for the Synthesis of Cyclic Di-GMP. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, 1804, 166–172.
- [61] Walker, J. A.; Rivera, S.; Weinert, E. E. Mechanism and Role of Globin Coupled Sensor Signaling. *Adv. Microb. Physiol.*, 2017, 71, 133–169.
- [62] Kitanishi, K.; Kobayashi, K.; Uchida, T.; Ishimori, K.; Igarashi, J.; Shimizu, T. Identification and Functional and Spectral Characterization of a Globin-Coupled Histidine Kinase from *Anaeromyxobacter* Sp. Fw109-5. *J. Biol. Chem.*, 2011, 286, 35522–35534.
- [63] Donné, J.; Van Kerckhoven, M.; Maes, L.; Cos, P.; Dewilde, S. The Role of the Globin-Coupled Sensor YddV in a Mature *E. Coli* Biofilm Population. *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, 1864, 835–839.
- [64] Freitas, T. A. K.; Saito, J. A.; Hou, S.; Alam, M. Globin-Coupled Sensors, Protoglobins, and the Last Universal Common Ancestor. *J. Inorg. Biochem.*, 2005, 99, 23–33.
- [65] Stranova, M.; Martínek, V.; Man, P.; Fojtikova, V.; Kavan, D.; Vaněk, O.; Shimizu, T.; Martínková, M. Structural Characterization of the Heme-Based Oxygen Sensor, AfGcHK, Its Interactions with the Cognate Response Regulator, and Their Combined Mechanism of Action in a Bacterial Two-Component Signaling System. *Proteins*, 2016, 84, 1375–1389.
- [66] Tang, K.; Knipp, M.; Liu, B. B.; Cox, N.; Stabel, R.; He, Q.; Zhou, M.; Scheer, H.; Zhao, K. H.; Gärtner, W. Redox-Dependent Ligand Switching in a Sensory Heme-Binding GAF Domain of the Cyanobacterium *Nostoc* Sp. PCC7120. *J. Biol. Chem.*, 2015, 290, 19067–19080.
- [67] Cho, H. Y.; Cho, H. J.; Kim, Y. M.; Oh, J. I.; Kang, B. S. Structural Insight into the Heme-Based Redox Sensing by DosS from *Mycobacterium Tuberculosis*. *J. Biol. Chem.*, 2009, 284, 13057–13067.
- [68] Sivaramakrishnan, S.; Ortiz de Montellano, P. R. The DosS-DosT/DosR Mycobacterial Sensor System. *Biosensors*, 2013, 3, 259–282.
- [69] Podust, L. M.; Ioanoviciu, A.; Ortiz de Montellano, P. R. 2.3 Å X-Ray Structure of the Heme-Bound GAF Domain of Sensory Histidine Kinase DosT of *Mycobacterium Tuberculosis*. *Biochemistry*, 2008, 47, 12523–12531.
- [70] Kaur, K.; Taneja, N. K.; Dhingra, S.; Tyagi, J. S. DevR (DosR) Mimetic Peptides Impair Transcriptional Regulation and Survival of *Mycobacterium Tuberculosis*

- under Hypoxia by Inhibiting the Autokinase Activity of DevS Sensor Kinase. *BMC Microbiology*, 2014, 14, 195.
- [71] Zheng, H.; Colvin, C. J.; Johnson, B. K.; Kirchhoff, P. D.; Wilson, M.; Jorgensen-Muga, K.; Larsen, S. D.; Abramovitch, R. B. Inhibitors of *Mycobacterium Tuberculosis* DosRST Signaling and Persistence. *Nat. Chem. Biol.*, 2017, 13, 218–225.
- [72] Gupta, V. K.; Kumar, M. M.; Singh, D.; Bisht, D.; Sharma, S. Drug Targets in Dormant *Mycobacterium Tuberculosis*: Can the Conquest against Tuberculosis Become a Reality? *Infectious Diseases*, 2018, 50, 81–94.
- [73] Henry, J. T.; Crosson, S. Ligand Binding PAS Domains in a Genomic, Cellular, and Structural Context. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2011, 65, 261–286.
- [74] Ho, Y. S.; Burden, L. M.; Hurley, J. H. Structure of the GAF Domain, a Ubiquitous Signaling Motif and a New Class of Cyclic GMP Receptor. *EMBO J.*, 2000, 19, 5288–5299.
- [75] Galperin, M. Y. Bacterial Signal Transduction Network in a Genomic Perspective. *Environ. Microbiol.*, 2004, 6, 552–567.
- [76] Key, J.; Moffat, K. Crystal Structures of Deoxy and CO-Bound *BjFixLH* Reveal Details of Ligand Recognition and Signaling. *Biochemistry*, 2005, 44, 4627–4635.
- [77] Möglich, A.; Ayers, R. A.; Moffat, K. Structure and Signaling Mechanism of Per-ARNT-Sim Domains. *Structure*, 2009, 17, 1282–1294.
- [78] Tuckerman, J. R.; Gonzalez, G.; Sousa, E. H. S.; Wan, X.; Saito, J. A.; Alam, M.; Gilles-Gonzalez, M. A. An Oxygen-Sensing Diguanylate Cyclase and Phosphodiesterase Couple for c-Di-GMP Control. *Biochemistry*, 2009, 48, 9764–9774.
- [79] Hengge, R. Principles of C-Di-GMP Signalling in Bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2009, 7, 263–273.
- [80] Tuckerman, J. R.; Gonzalez, G.; Gilles-Gonzalez, M. A. Cyclic Di-GMP Activation of Polynucleotide Phosphorylase Signal-Dependent RNA Processing. *J. Mol. Biol.*, 2011, 407, 633–639.
- [81] Kitanishi, K.; Kobayashi, K.; Kawamura, Y.; Ishigami, I.; Ogura, T.; Nakajima, K.; Igarashi, J.; Tanaka, A.; Shimizu, T. 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*, 2010, 49, 10381–10393.
- [82] Tagliabue, L.; Maciag, A.; Antoniani, D.; Landini, P. The YddV-Dos Operon Controls Biofilm Formation through the Regulation of Genes Encoding Curli Fibers' Subunits in Aerobically Growing *Escherichia Coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2010, 59, 477–484.
- [83] Shimizu, T. The Heme-Based Oxygen-Sensor Phosphodiesterase *Ec* DOS (DosP): Structure-Function Relationships. *Biosensors*, 2013, 3, 211–237.
- [84] Yoshimura, T.; Sagami, I.; Sasakura, Y.; Shimizu, T. Relationships between Heme Incorporation, Tetramer Formation, and Catalysis of a Heme-Regulated Phosphodiesterase from *Escherichia Coli*: A Study of Deletion and Site-Directed Mutants. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 53105–53111.
- [85] Kurokawa, H.; Lee, D. S.; Watanabe, M.; Sagami, I.; Mikami, B.; Raman, C. S.; Shimizu, T. A Redox-Controlled Molecular Switch Revealed by the Crystal Structure of a Bacterial Heme PAS Sensor. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 20186–20193.
- [86] Park, H.; Suquet, C.; Satterlee, J. D.; Kang, C. Insights into Signal Transduction Involving PAS Domain Oxygen-Sensing Heme Proteins from the X-Ray Crystal

- Structure of *Escherichia Coli* Dos Heme Domain (*Ec* DosH). *Biochemistry*, 2004, 43, 2738–2746.
- [87] The UniProt Consortium. UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.*, 2021, 49, D480–D489.
- [88] Schmidt, A. J.; Ryjenkov, D. A.; Gomelsky, M. The Ubiquitous Protein Domain EAL Is a Cyclic Diguanylate-Specific Phosphodiesterase: Enzymatically Active and Inactive EAL Domains. *J. Bacteriol.*, 2005, 187, 4774–4781.
- [89] Hengge, R.; Galperin, M. Y.; Ghigo, J. M.; Gomelsky, M.; Green, J.; Hughes, K. T.; Jenal, U.; Landini, P. Systematic Nomenclature for GGDEF and EAL Domain-Containing Cyclic Di-GMP Turnover Proteins of *Escherichia Coli*. *J. Bacteriol.*, 2015, 198, 7–11.
- [90] Tarnawski, M.; Barends, T. R. M.; Hartmann, E.; Schlichting, I. Structures of the Catalytic EAL Domain of the *Escherichia Coli* Direct Oxygen Sensor. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 2013, 69, 1045–1053.
- [91] Tanaka, A.; Shimizu, T. Ligand Binding to the Fe(III)-Protoporphyrin IX Complex of Phosphodiesterase from *Escherichia Coli* (*Ec* DOS) Markedly Enhances Catalysis of Cyclic Di-GMP: Roles of Met95, Arg97, and Phe113 of the Putative Heme Distal Side in Catalytic Regulation and Ligand Binding. *Biochemistry*, 2008, 47, 13438–13446.
- [92] Lechauve, C.; Bouzahir-Sima, L.; Yamashita, T.; Marden, M. C.; Vos, M. H.; Liebl, U.; Kiger, L. Heme Ligand Binding Properties and Intradimer Interactions in the Full-Length Sensor Protein Dos from *Escherichia Coli* and Its Isolated Heme Domain. *J. Biol. Chem.*, 2009, 284, 36146–36159.
- [93] Yan, F.; Fojtikova, V.; Man, P.; Stranova, M.; Martínková, M.; Du, Y.; Huang, D.; Shimizu, T. Catalytic Enhancement of the Heme-Based Oxygen-Sensing Phosphodiesterase *Ec*DOS by Hydrogen Sulfide Is Caused by Changes in Heme Coordination Structure. *Biometals*, 2015, 28, 637–652.
- [94] Ishitsuka, Y.; Araki, Y.; Tanaka, A.; Igarashi, J.; Ito, O.; Shimizu, T. Arg97 at the Heme-Distal Side of the Isolated Heme-Bound PAS Domain of a Heme-Based Oxygen Sensor from *Escherichia Coli* (*Ec* DOS) Plays Critical Roles in Autoxidation and Binding to Gases, Particularly O₂. *Biochemistry*, 2008, 47, 8874–8884.
- [95] Tanaka, A.; Takahashi, H.; Shimizu, T. Critical Role of the Heme Axial Ligand, Met95, in Locking Catalysis of the Phosphodiesterase from *Escherichia Coli* (*Ec* DOS) toward Cyclic DiGMP. *J. Biol. Chem.*, 2007, 282, 21301–21307.
- [96] Sasakura, Y.; Hirata, S.; Sugiyama, S.; Suzuki, S.; Taguchi, S.; Watanabe, M.; Matsui, T.; Sagami, I.; Shimizu, T. Characterization of a Direct Oxygen Sensor Heme Protein from *Escherichia Coli*. Effects of the Heme Redox States and Mutations at the Heme-Binding Site on Catalysis and Structure. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 23821–23827.
- [97] Gasteiger, E.; Gattiker, A.; Hoogland, C.; Ivanyi, I.; Appel, R. D.; Bairoch, A. ExPASy: The Proteomics Server for in-Depth Protein Knowledge and Analysis. *Nucleic Acids Res.*, 2003, 31, 3784–3788.
- [98] Trčka, F.; Durech, M.; Vaňková, P.; Chmelík, J.; Martínková, V.; Hausner, J.; Kadek, A.; Marcoux, J.; Klumpler, T.; Vojtesek, B.; Muller, P.; Man, P. Human Stress-Inducible Hsp70 Has a High Propensity to Form ATP-Dependent Antiparallel Dimers That Are Differentially Regulated by Cochaperone Binding. *Mol. Cell. Proteomics*, 2019, 18, 320–337.
- [99] Stranova, M.; Man, P.; Skálová, T.; Kolenko, P.; Bláha, J.; Fojtíková, V.; Martínek, V.; Dohnálek, J.; Lengalova, A.; Rosůlek, M.; Shimizu, T.; Martínková, M.

- Coordination and Redox State-Dependent Structural Changes of the Heme-Based Oxygen Sensor AfGcHK Associated with Intraprotein Signal Transduction. *J. Biol. Chem.*, 2017, 292, 20921–20935.
- [100] Sharma, D.; Misba, L.; Khan, A. U. Antibiotics versus Biofilm: An Emerging Battleground in Microbial Communities. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, 2019, 8, 76.
- [101] Gilles-Gonzalez, M. A.; Gonzalez, G. Signal Transduction by Heme-Containing PAS-Domain Proteins. *J. Appl. Physiol.*, 2004, 96, 774–783.
- [102] Bowler, P.; Murphy, C.; Wolcott, R. Biofilm Exacerbates Antibiotic Resistance: Is This a Current Oversight in Antimicrobial Stewardship? *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, 2020, 9, 162.
- [103] Fojtíková, V. Důležité Role Hemu: Signál pro Hem-Detekující Proteiny a Detekční Místo v Plyn-Detekujících Proteinech. Bakalářská práce, Přírodovědecká Fakulta, Katedra biochemie: Praha, 2012.
- [104] Mihalčín, P. Štúdium Mechanizmu Prenosu Signálu v Prípade Dvoch Modelových Zástupcov Hemových Sensorových Proteínov. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká Fakulta, Katedra biochemie: Praha, 2019.
- [105] Kinsland, C. 9.19 - Bacterial Protein Overexpression Systems and Strategies. In *Comprehensive Natural Products II*; Liu, H.-W. (Ben); Mander, L., Eds.; Elsevier: Oxford, 2010; 695–721.
- [106] Vávra, J. Porovnání Vlastností Transkripčního Faktoru “Bach1” v Jeho Apoforně a Holoformě. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká Fakulta, Katedra biochemie: Praha, 2019.
- [107] Verde, V. L.; Dominici, P.; Astegno, A. Determination of Hydrodynamic Radius of Proteins by Size Exclusion Chromatography. *Bio-protocol*, 2017, 7, e2230–e2230.
- [108] Sasakura, Y.; Yoshimura-Suzuki, T.; Kurokawa, H.; Shimizu, T. Structure—Function Relationships of EcDOS, a Heme-Regulated Phosphodiesterase from *Escherichia Coli*. *Acc. Chem. Res.*, 2006, 39, 37–43.
- [109] Walker, J. A.; Rivera, S.; Weinert, E. E. Chapter Three – Mechanism and Role of Globin-Coupled Sensor Signalling. In *Advances in Microbial Physiology*; Poole, R. K., Ed.; Academic Press, 2017; 71, 133–169.
- [110] Masson, G. R.; Burke, J. E.; Ahn, N. G.; Anand, G. S.; Borchers, C.; Brier, S.; Bou-Assaf, G. M.; Engen, J. R.; Englander, S. W.; Faber, J.; Garlish, R.; Griffin, P. R.; Gross, M. L.; Guttman, M.; Hamuro, Y.; Heck, A. J. R.; Houde, D.; Jacob, R. E.; Jørgensen, T. J. D.; Kaltashov, I. A.; Klinman, J. P.; Konermann, L.; Man, P.; Mayne, L.; Pascal, B. D.; Reichmann, D.; Skehel, M.; Snijder, J.; Strutzenberg, T. S.; Underbakke, E. S.; Wagner, C.; Wales, T. E.; Walters, B. T.; Weis, D. D.; Wilson, D. J.; Wintrode, P. L.; Zhang, Z.; Zheng, J.; Schriemer, D. C.; Rand, K. D. Recommendations for Performing, Interpreting and Reporting Hydrogen Deuterium Exchange Mass Spectrometry (HDX-MS) Experiments. *Nat. Methods*, 2019, 16, 595–602.