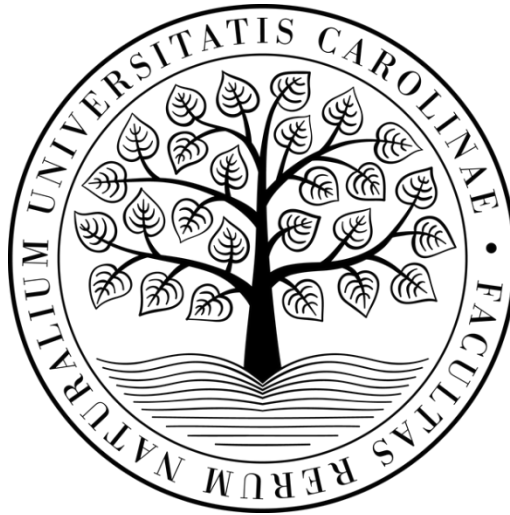


UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie



Bc. Dominika Andrllová

Struktura a funkce modelového zástupce dvoukomponentních signalizačních systémů

Structure and function of the model representative of two-component signal systems

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: prof. RNDr. Markéta Martínková, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Daniel Rozbeský, Ph.D.

Praha 2025

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 30. 4. 2025



.....

Abstrakt

Dvoukomponentní signalizační systémy představují jeden z nejrozšířenějších způsobů signální transdukce u bakterií, který je využíván pro detekci podnětů z okolí a následné zprostředkování adekvátní odpovědi na přijatý signál. Jedním z modelových zástupců dvoukomponentních signalizačních systémů je proteinový komplex histidinkinázy obsahující globinovou doménu z bakterie *Anaeromyxobacter sp Fw. 109-5* (AfGcHK) a příslušného regulátoru odpovědi. Histidinkináza AfGcHK slouží jako senzor kyslíku, který umožňuje bakterii určit, zda se nachází v aerobním či anaerobním prostředí. Aktivace AfGcHK spočívá v navázání kyslíku na molekulu hemu v senzorové doméně, které je následováno autofosforylační reakcí ve funkční doméně enzymu. Další krok zahrnuje fosfotransferázovou reakci, při které je fosforylová skupina z AfGcHK přenesena na příslušný regulátor odpovědi. Doposud nebyla objasněna struktura komplexu AfGcHK:RR přímými metodami, a také není zcela známý mechanismus fosfotransferázové reakce. Předmětem této práce je zmíněné odhalení struktury komplexu užitím kryoelektronové mikroskopie a následná diskuse možných způsobů přenosu fosforylové skupiny mezi jednotlivými komponentami komplexu.

Klíčová slova: dvoukomponentní signalizační systémy, histidinkináza, regulátor odpovědi, kryoelektronová mikroskopie

Abstract

Two-component signalling systems represent one of the most widely used signal transduction pathways in bacteria, which are used to detect environmental stimuli and then mediate an appropriate response to the received signal. A model representative of two-component systems is the histidine kinase protein complex containing the globin domain from *Anaeromyxobacter sp Fw. 109-5* (AfGcHK) and the corresponding response regulator. The AfGcHK histidine kinase serves as an oxygen sensor that allows the bacterium to determine whether it is in an aerobic or anaerobic environment. Activation of the AfGcHK histidine kinase involves the binding of an oxygen molecule to the sensor domain heme molecule, which is followed by an autophosphorylation reaction in the functional domain of the enzyme. The next step involves a phosphotransferase reaction involving the phosphoryl group from AfGcHK being transferred to the appropriate response regulator. To date, the structure of the AfGcHK:RR complex has not been elucidated by direct methods, and the mechanism of the phosphotransferase reaction is also not fully understood. The subject of this work is to reveal the structure of the complex using cryoelectron microscopy and the subsequent discussion of possible ways of phosphoryl group transfer between the individual components of the complex.

Key words: two-component signal systems, histidin kinase, response regulator, cryo-electron microscopy

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce prof. RNDr. Markétě Martínkové, Ph.D. za odborné vedení při vypracování této práce, za ochotu poradit a za její lidský přístup. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Danielovi Rozbeskému, Ph.D. za možnost navázání spolupráce s jeho laboratoří, za odborné konzultace a otevřený přátelský přístup. Děkuji i svým kolegům Mgr. Tomášovi Smrčkovi, Mgr. Evě Fridriškové, Mgr. Lukrécii Sophii Vojáčkové a Mgr. Dominikovi Paškovi za pomoc a rady při experimentální práci v laboratoři. Na závěr bych chtěla poděkovat všem členům rodiny, především Jakubovi, kteří mně podporovali a věnovali za mě svůj čas synovi Teodorovi, abych mohla tuto práci zdárně dokončit.

Obsah

1 ÚVOD	11
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
2.1 Dvoukomponentní signalizační systémy bakterií	12
2.1.1 Histidinkináza – první složka dvoukomponentního signalizačního systému	13
2.1.1.1 Funkční kinázová doména	14
2.1.1.2 Senzorová doména	15
2.1.2 Regulátor odpovědi – druhá složka dvoukomponentního signalizačního systému	17
2.1.2.1 Rec doména	17
2.1.2.2 Efektorová doména	18
2.1.3 Mechanismus přenosu signálu u dvoukomponentních systémů	18
2.1.3.1 Přenos signálu ze senzorové domény na kinázovou doménu	18
2.1.3.2 Autofosforylace	19
2.1.3.3 Přenos fosforylové skupiny na RR	20
2.2 Proteinový komplex <i>A/GcHK:RR</i>	22
2.2.1 Struktura <i>A/GcHK</i> a RR	22
2.2.1.1 Dimerizační rozhraní <i>A/GcHK</i>	23
2.2.2 Přenos signálu v komplexu <i>A/GcHK:RR</i>	24
3 CÍLE PRÁCE	28
4 MATERIÁL A PŘÍSTROJE	29
4.1 Použité chemikálie	29
4.2 Použité přístroje	31
5 METODY	33
5.1 Příprava rekombinantních proteinů <i>A/GcHK</i> -His tag, <i>A/GcHK</i> -MBP tag a RR-His tag	33
5.1.1 Příprava agarových ploten pro kultivaci buněk	33
5.1.2 Transformace buněk <i>E. coli</i> BL-21 (DE3) a jejich následná kultivace	33
5.1.3 Exprese proteinů <i>A/GcHK</i> -His tag, <i>A/GcHK</i> -MBP tag a RR-His tag	34
5.1.4 Izolace proteinů <i>A/GcHK</i> -His tag, <i>A/GcHK</i> -MBP tag a RR-His tag	35
5.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů <i>A/GcHK</i> -His tag, <i>A/GcHK</i> -MBP tag a RR-His tag	37
5.3 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)	37
5.4 Analýza mechanismu přenosu signálu v komplexu <i>A/GcHK:RR</i> pomocí Phos-tag elektroforézy ..	39
5.5 Modelování struktury komplexu <i>A/GcHK:RR</i> pomocí programu AlphaFold3	40

5.6	Kryoelektronová mikroskopie komplexu AfGCHK:RR a proteinu AfGCHK-MBP tag	41
5.6.1	Příprava vzorků pro kryoelektronovou mikroskopii	41
5.6.2	Negativní barvení	41
5.6.3	Kryoelektronová mikroskopie.....	42
6	VÝSLEDKY	44
6.1	Příprava rekombinantních proteinů AfGCHK-His tag, AfGCHK-MBP tag a RR-His tag.....	44
6.1.1	Exprese rekombinantních proteinů AfGCHK-His tag, AfGCHK-MBP tag a RR-His tag	44
6.1.2	Izolace rekombinantních proteinů AfGCHK-His tag, AfGCHK-MBP tag a RR-His tag	44
6.2	Mechanismus autofosforylační a fosfotransferázové reakce v rámci proteinového komplexu AfGCHK:RR	47
6.3	Modelování struktury komplexu AfGCHK:RR pomocí programu AlphaFold3	49
6.4	Kryoelektronová mikroskopie komplexu AfGCHK:RR.....	52
6.4.1	Negativní barvení	52
6.4.2	Kryoelektronová mikroskopie komplexu AfGCHK:RR	55
6.5	Kryoelektronová mikroskopie proteinu AfGCHK-MBP tag.....	60
7	DISKUSE	61
8	ZÁVĚR.....	70
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	72

Seznam zkratek a symbolů

AfGcHK	histidinkináza s globinovou doménou z organismu <i>Anaeromyxobacter sp.</i> Fw109-5
BIS	N,N'-methylen-bis-akrylamid
CTF	funkce přenosu kontrastu (z angl. contrast transfer function)
CHAPSO	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-2-hydroxy-1-propansulfonát
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. ethylenediamine-tetraacetic acid)
Fab fragment	část protilátky, která je zodpovědná za vazbu antigenu (z angl. fragment antigen-binding region)
FSC	Fourierova korelace slupek (z angl. Fourier shell correlation)
GAF doména	senzorová doména, název odvozen od proteinů fosfodiesterázy stimulované c-GMP, adenylátcyklázy <i>Adabanea</i> , Fh1A <i>E. coli</i>
GST tag	kotva tvořená glutathion-S-transferázou
HAMP doména	doména bakteriálních signalizačních proteinů (název odvozen od skupin proteinů obsahujících tuto doménu: <u>h</u> istidinkinázy, <u>a</u> denylylcyklázy, proteiny akceptující <u>m</u> ethyl a <u>p</u> rokaryotické signalizační proteiny)
HDX-MS	metoda vodíko-deuteriové výměny následovaná hmotnostní spektrometrií
His tag	histidinová kotva
IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid
ipTM	hodnota přesnosti interakce mezi jednotlivými podjednotkami v modelu z programu AlphaFold3 (z angl. interface predicted template modeling)

LB agar	Luria-Bertani agar
LB médium	Luria-Bertani Broth médium
MBP tag	kotva tvořená proteinem vázajícím maltózu (z angl. maltose binding protein)
PAE	předpokládaná chyba pozice (Å) daného aminokyselinového zbytku vzhledem k pozici jiného aminokyselinového zbytku proteinu v modelu z programu AlphaFold3 (z angl. predicted aligned error)
PAS doména	senzorová doména, název odvozen od proteinů <u>P</u> er, <u>A</u> rnst a <u>S</u> im
PDC doména	senzorová doména, název odvozen od proteinů <u>P</u> hoQ, <u>D</u> cuS a <u>C</u> itA
plDDT	hodnota spolehlivosti jednotlivých aminokyselinových zbytků v modelu z programu AlphaFold3 (z angl. predicted local distance difference test)
PMSF	fenylmethanolsulfonylfluorid
pTM	hodnota celkové přesnosti modelu v programu AlphaFold3 (z angl. predicted template modeling)
Rec doména	konzervovaná doména regulátoru odpovědi (z angl. receiver domain)
RR	regulátor odpovědi (z angl. response regulator)
RPM	otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
SDS-PAGE	diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (z angl. sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)
STAC doména	doména bakteriálních signálních proteinů (název vytvořen z komponenty asociované s přenašeči rozpustných látek a tuberózním sklerózovým komplexem, z angl. <u>s</u> olute carrier protein/ <u>t</u> uberous sclerosis complex- <u>a</u> ssociated <u>c</u> omponent)

TB médium	Terrific Broth médium
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
v/v	objemová procenta
w/v	hmotnostně-objemová procenta

1 Úvod

Jeden z nejrozšířenějších způsobů přenosu signálů v bakteriích zahrnuje využití dvoukomponentních signalizačních systémů. Jedná se o funkční uskupení dvou (ale i více) proteinů, z nichž jeden funguje jako senzor přijímající signál, a druhý představuje funkční komponentu vyvolávající odpověď na daný signál. Roli senzoru ve dvoukomponentních signalizačních systémech zastává enzym histidinkináza, jež se skládá ze sensorové domény detekující signál a funkční kinázové domény, která šíří signál na druhou komponentu systému, tzv. regulátor odpovědi (RR, z angl. response regulator). Aminokyselinová sekvence kinázové domény je vysoce konzervovaná, proto má u různých typů histidinkináz velmi podobnou strukturu. Naopak sensorových domén je více druhů, což umožňuje dvoukomponentním systémům reagovat na nejrůznější podněty z okolí. Rolí histidinkinázy je aktivovat RR, který zprostředkovává vyvolání buněčné odpovědi. RR může fungovat jako enzym katalyzující další dílčí reakce signalizační kaskády, či přímo jako transkripční faktor ovlivňující genovou expresi¹.

Proteinový komplex histidinkinázy obsahující globinovou doménu z bakterie *Anaeromyxobacter sp Fw. 109-5* (AfGcHK) a příslušného RR představuje modelového zástupce dvoukomponentních signalizačních systémů. Proces signální transdukce je zahájen aktivací histidinkinázy AfGcHK, která slouží jako senzor kyslíku. Navázání kyslíku na molekulu hemu v sensorové doméně AfGcHK zajistí aktivaci enzymu, která spustí autofosforylační reakci v kinázové doméně proteinu. Fosforylová skupina je následně v rámci fosfotransferázové reakce přenesena na druhou složku systému RR, který vyvolá požadovanou odpověď na přijatý signál. Zajímavostí je, že sensorová doména AfGcHK obsahuje globinový motiv, jenž se u žádné další histidinkinázy neobjevuje. AfGcHK je tak první objevenou histidinkinázou, která je tvořena kombinací kinázové funkční domény a globinové sensorové domény².

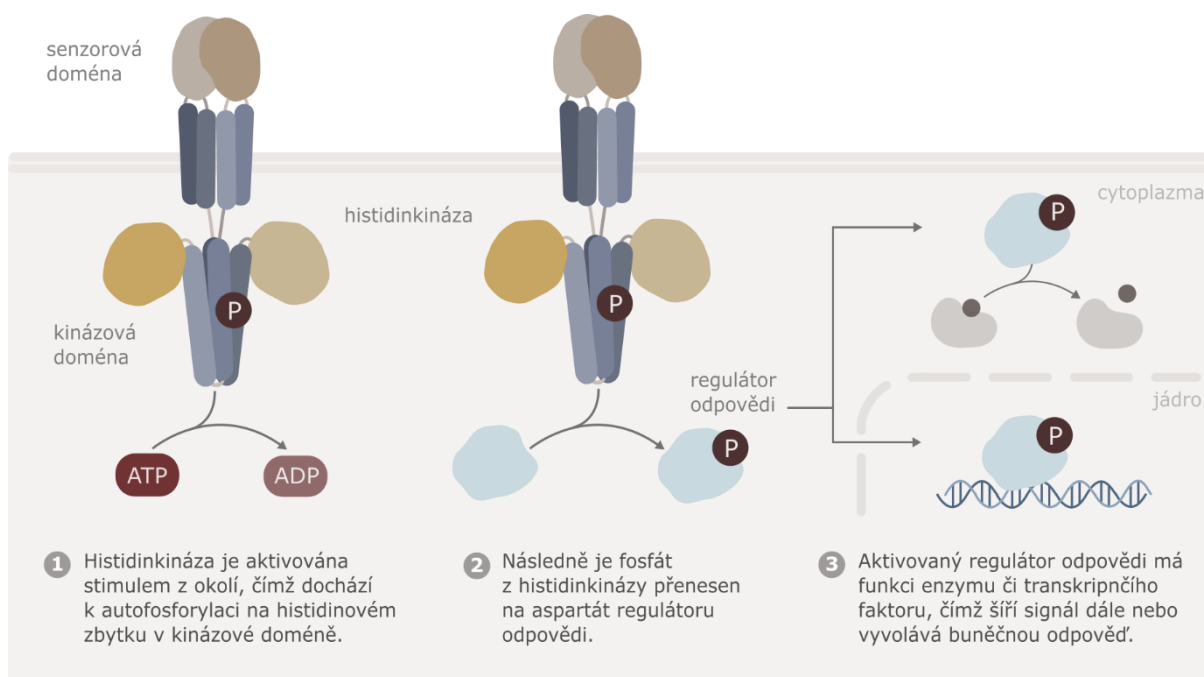
Kvůli velké flexibilitě úseku spojující sensorovou a funkční doménu nebyla doposud přímými metodami objasněna struktura celé histidinkinázy AfGcHK, tudíž ani komplexu AfGcHK:RR. Odhalení celé struktury komplexu by mohlo pomoci lépe objasnit mechanismus, jakým dochází k přenosu signálu mezi jednotlivými komponentami systému. Proto je cílem této práce zmiňovanou strukturu komplexu AfGcHK:RR odhalit za použití nejnovějších přímých metod a následně diskutovat možné mechanismy, jakými dochází k transdukci signálu.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Dvoukomponentní signalizační systémy bakterií

Existuje mnoho způsobů, kterými organismy přijímají signály ze svého okolí, dále je zpracovávají a šíří až ke konečnému činiteli, jenž vyvolává požadovanou buněčnou odpověď. Díky těmto různorodým signalizačním kaskádám jsou organismy schopny reagovat na změny v prostředí, náležitě na ně odpovědět a přizpůsobit se. Proces signální transdukce zahrnuje zachycení signálu, jeho následné šíření, a nakonec vyvolání příslušné odpovědi. Neméně důležité je však i ukončení procesu signalizace, aby buněčná odpověď netrvala déle, než je nezbytně nutné.

Jedním ze způsobů šíření signálu je i takzvaný dvoukomponentní signalizační systém. Jak už z názvu vyplývá, jedná se o systém složený ze dvou komponent, jimiž jsou histidinkináza a RR. Tento typ signalizačního systému je rozšířený napříč všemi skupinami organismů a účastní se regulace různých buněčných procesů. Velmi hojně se vyskytuje u prokaryot, ale obsahují ho i eukaryota, u kterých jinak převládá signalizace skrze serinové, threoninové a tyrosinové proteinkinázy. Například *Escherichia coli* obsahuje dokonce 30 různých histidinkináz a 32 RR³. Příkladem je systém histidinkinázy CheA a RR CheY, které hrají roli v regulaci bakteriální chemotaxe⁴. U eukaryotních organismů dvoukomponentní signalizační systémy účastní například kontroly procesů osmoregulace u *Sacharomyces cerevisiae*⁵ nebo zrání plodů řízeného ethylenem u rostlin rajčete⁶.



Obrázek 1: Mechanismus přenosu signálu ve dvoukomponentním signalizačním systému bakterií. Schéma vytvořeno dle⁹⁸.

Šíření signálu skrze dvoukomponentní systémy probíhá následujícím způsobem (Obrázek 1, str. 12). První složkou systému je histidinkináza, která přijímá signál z okolí pomocí sensorové domény. Takovým signálem může být například změna teploty⁷, světelných podmínek⁸, hladiny kyslíku⁹ nebo koncentrace různých ligandů¹⁰. Na základě toho, o jaký z těchto stimulů z okolního prostředí se jedná, je uzpůsobena funkce sensorové domény konkrétního dvoukomponentního systému. Zachycení signálu vyvolá aktivaci histidinkinázy vedoucí k autofosforylační reakci na histidinovém zbytku v kinázové doméně, díky které se vytváří vysoce energetická fosforylová skupina. Následně je tato fosforylová skupina z histidinkinázy přenesena na aspartátový zbytek RR, který posléze vyvolá buněčnou odpověď či šíří signál na další komponenty signalizační kaskády¹¹. Funkce RR mohou být opět různé, může se jednat například o enzym^{12,13} či transkripční faktor, který napřímo ovlivní genovou expresi¹⁴. Jak bylo výše zmíněno, velmi důležitou součástí signální transdukce je i ukončení signalizace. Mechanismů, kterými dochází k defosforylaci RR, je více, avšak nejrozšířenějším způsobem je zpětné přenesení fosfátu z RR na histidinkinázu. Proto histidinkináza kromě kinázové aktivity vykazuje také i fosfatázovou aktivitu, při které dochází k odstranění fosforylové skupiny z aspartátu RR^{15,16}.

2.1.1 Histidinkináza – první složka dvoukomponentního signalizačního systému

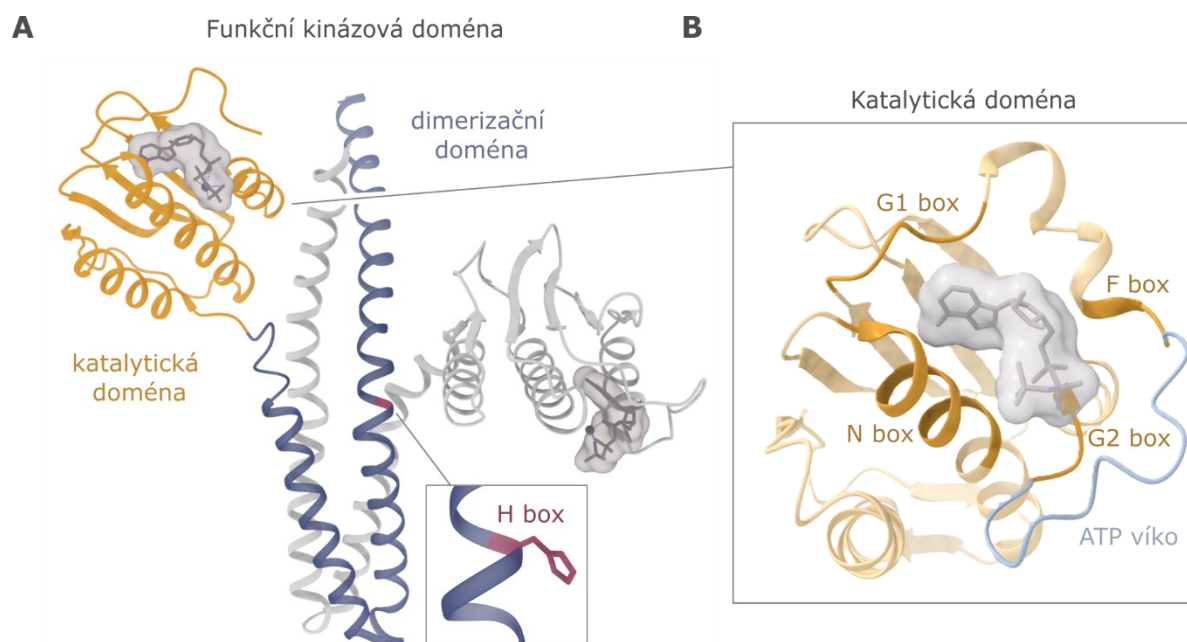
V současné době můžeme histidinkinázy rozdělit do tří jednotlivých skupin. První třídou jsou histidinkinázy, které fungují samostatně a mají autokinázovou, fosfotransferázovou i fosfatázovou aktivitu. Nejčastěji jsou tyto histidinkinázy transmembránové, ale mohou se také vyskytovat volně rozpuštěné v cytosolu¹⁷. Do druhé třídy patří histidinkinázy, jež mohou být cytoplazmatické i transmembránové, ale jejich hlavní odlišností je chybějící sensorová doména. Funkci sensorové domény v tomto případě nahrazuje interakce histidinkinázy s různými typy receptorových proteinů, které stejně jako sensorová doména zpracovávají signál z okolí a aktivují příslušnou histidinkinázu¹⁸. Poslední třetí třídu představují nedávno objevené histidinkinázy, které kombinují charakteristiky obou předchozích tříd¹⁹.

Většina histidinkináz se vyskytuje v podobě dimeru. Jednotlivé monomery jsou v nejjednodušší formě tvořeny sensorovou, kinázovou a případně i transmembránovou doménou. Sensorová doména je velmi variabilní a existují různé typy napříč organismy, v závislosti na tom, jaký typ signálu má být zachycen. Naopak kinázová doména je vysoce konzervovaná a u většiny histidinkináz se objevují stejné či podobné strukturní motivy. Kombinace různých typů sensorových domén s konzervovanou kinázovou doménou umožnila vznik histidinkináz rozeznávajících rozmanité druhy signálů, u kterých je však zajištěna

jednotná odpověď v podobě autofosforylace a následné fosfotransferázové reakce na RR¹. Transmembránové histidinkinázy obsahují navíc doménu, která zajišťuje ukotvení proteinu v membráně. Tyto domény mají několik různých podob. Některé z těchto domén prochází membránou pouze jednou^{20,21} jiné i vícekrát²², nejvíce jsou však zastoupeny histidinkinázy, jejichž transmembránová doména je tvořena dvěma procházejícími α -helixy²³.

2.1.1.1 Funkční kinázová doména

Společným znakem všech histidinkináz je jejich konzervovaná kinázová doména, která je zodpovědná za navázání ATP, následnou autofosforylaci a přenos fosforylové skupiny na RR. Kinázová doména se skládá z dimerizační domény, která hraje zásadní roli při tvorbě homodimeru dvou histidinkinázových podjednotek. Zároveň také obsahuje histidinový zbytek, na který je přenesena fosforylová skupina z ATP v autofosforylační reakci. Druhou složkou kinázové domény je katalytická doména, která obsahuje vazebné místo pro ATP (Obrázek 2). V kinázové doméně je několik konzervovaných úseků aminokyselin, které se objevují u většiny histidinkináz. Jedná se o tzv. H, N, F, G1 a G2 box, přičemž H box je součástí dimerizační domény a zbylé N, F, G1 a G2 boxy se nacházejí v katalytické doméně^{1,24}.



Obrázek 2: Struktura kinázové domény histidinkináz. A) Kinázová doména je tvořena katalytickou (oranžově) a dimerizační doménou (modře). Dimerizační doména je tvořena dvěma α -helixy, které vytvářejí interakci s helixy druhé podjednotky kinázové domény a podílí se tak na tvorbě homodimeru. Zároveň dimerizační doména obsahuje histidinový zbytek (fialově) sloužící jako místo fosforylace. Zobrazeno na histidinkináze *B. subtilis* DesK (PDB: 3GIG). B) Katalytická doména je tvořena třemi α -helixy a dvěma β -lisy, obsahuje vazebné místo pro ATP, které je tvořeno konzervovanými úseky N, F, G1 a G2. Mezi úseky F a G2 se nachází tzv. ATP víko, které uzavírá nukleotid v aktivním místě. Zobrazeno na histidinkináze *E. coli* PhoQ (PDB: 1ID0). Vytvořeno v programu ChimeraX ver. 1.9.

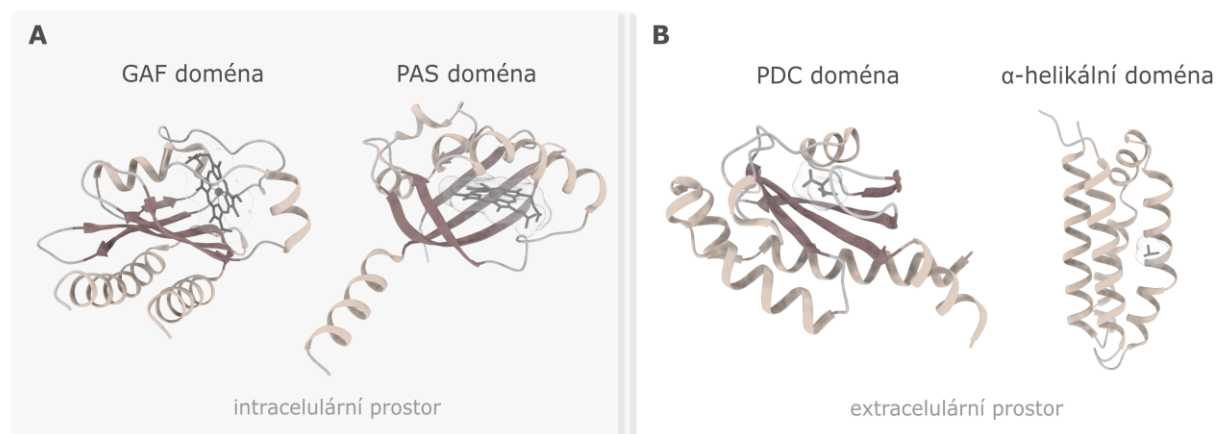
Dimerizační doménu tvoří vlásenka dvou α -helixů, která interaguje s vlásenkou druhého monomeru histidinkinázy, čímž vzniká svazek čtyř α -helixů, a umožňuje tak dvěma podjednotkám histidinkinázy utvořit homodimer. Přibližně uprostřed α_1 -helixu je umístěna konzervovaná sekvence H box obsahující histidinový zbytek, jenž je substrátem pro autofosforylaci²⁵. Zároveň hrají dimerizační doména i zmíněný histidinový zbytek důležitou roli při fosfatázové reakci zprostředkované histidinkinázou^{15,16}. Katalytická doména je tvořena α/β sendvičem, který se skládá z 5 antiparalelních β -listů a třech α -helixů. Stejný motiv je přítomný i u některých ATPáz vyskytujících se napříč prokaryotními i eukaryotními organismy, například DNAgyráza B, opravný enzym MutL nebo chaperon Hsp90²⁶. Součástí katalytické domény je vazebné místo pro ATP, jenž je tvořeno N, F, G1 a G2 boxy. Mezi F a G2 boxem se nachází flexibilní úsek označován jako ATP víko (z angl. ATP-lid), který mění svou konformaci v závislosti na tom, zda je v aktivním místě navázáno ATP. Pokud je nukleotid navázán, ATP víko skutečně funguje jako jakési víko překrývající nukleotid, a naopak pokud je nukleotid nepřítomný, víko přechází ve více flexibilní strukturu^{27,28}.

2.1.1.2 Senzorová doména

Zatímco kinázová doména je u histidinkináz vysoce konzervovanou strukturou, sensorové domény jsou naopak různé a liší se od sebe svou strukturou a funkcí. Propojení různých sensorových domén s vysoce konzervovanou kinázovou doménou zajišťuje jednotný způsob transdukce signálu jako odpověď na rozdílné stimuly. Díky tomu jsou histidinkinázy schopné zaznamenávat například rozdílnou teplotu, jako je tomu u proteinu DesK *Bacillus subtilis*, který změnu teploty detekuje na základě fluidity membrány⁷. Dále existují histidinkinázy, jejichž funkce je regulována měnicími se světelnými podmínkami⁸. Mnohé histidinkinázy detekují různé malé ligandy, například CitA *Mycobacterium tuberculosis* detekuje citrát¹⁰, KinD *B. subtilis* detekuje pyruvát²⁹ a NarX *E. coli* detekuje nitrát³⁰. Histidinkinázy mohou detekovat také molekuly plynu za pomoci Fe-S klastrů (protein NreB *Staphylococcus carnosus*)⁹ či hemu (protein FixL *Bradyrhizobium japonicum*)³¹.

Histidinkinázy můžeme rozdělit do dvou skupin na transmembránové a volně rozpustné v cytoplazmě. Zda se histidinkináza nachází v cytoplazmě, či je ukotvená v membráně, je dáno typem signálu, jež má její sensorová doména zachytit. Na základě toho můžeme sensorové domény histidinkináz rozdělit na cytoplazmatické a extracelulární. Cytoplazmatické sensorové domény se vyskytují u histidinkináz volně rozpustných v cytoplazmě, ale jsou přítomny i u transmembránových histidinkináz v cytoplazmatické části proteinu, kde slouží jako přídatné sensorové domény zachytávající intracelulární signály. Nejčastější cytoplazmatickou

doménou je PAS doména (název odvozen od proteinů Per, Arnt a Sim, u kterých byla poprvé identifikována) a GAF doména (název odvozen od fosfodiesteráz stimulovaných c-GMP, adenylátcykláz *Adabanea* a Fh1A *E. coli*)³². PAS doména je tvořena motivem pěti antiparalelních β -listů a několika α -helixů, jejichž počet a umístění se u různých proteinů liší³³. Příkladem je PAS doména cytoplazmatické histidinkinázy NreB *S. carnosus*, která obsahuje konzervované cysteinové zbytky utvářející $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ klastr, pomocí kterého detekují molekulu O_2 ³⁴. Dalším příkladem histidinkinázy s PAS doménou je FixL *B. japonicum* detekující kyslík pomocí hemu, jenž je navázán v PAS doméně (Obrázek 3, část A vpravo)³¹. Druhou cytoplazmatickou doménou je GAF doména, která je svou strukturou velmi podobná PAS doméně. Je tvořena šesti antiparalelními β -listy a pěti α -helixy, jejichž počet se také může různit³⁵. Příkladem jsou histidinkinázy DosS a DosT *M. tuberculosis*, které mají v sensorové doméně navázanou molekulu hemu a slouží jako redoxní senzory (Obrázek 3, část A vlevo)^{36,37}.



Obrázek 3: Typy sensorových domén histidinkináz. A) Extracelulární sensorové domény – PDC doména histidinkinázy DcuS *E. coli*, která detekuje přítomnost fumarátu (PDB: 3BY8), alfa-helikální doména histidinkinázy NarX *E. coli*, jež detekuje přítomnost nitrátu (PDB: 3EZI). B) Cytoplazmatické sensorové domény – GAF doména histidinkinázy DosS *M. tuberculosis*, který pomocí navázaného hemu detekuje přítomnost kyslíku (PDB: 2W3D), PAS doména histidinkinázy FixL *B. japonicum* detekující přítomnost kyslíku za pomoci hemu (PDB: 1DRM). Vytvořeno v programu ChimeraX ver. 1.9.

Nejčastější extracelulární sensorovou doménou histidin kináz je PDC doména (název odvozen od proteinů PhoQ, DcuS a CitA, u kterých byla poprvé identifikována). Je tvořena motivem pěti antiparalelních β -listů a několika α -helixů³⁸. Strukturou je velmi podobná výše popisované PAS doméně, nicméně se liší v helikálních strukturách na C a N konci³⁹. Příkladem je PDC doména histidinkinázy DcuS *E. coli*, jejímž ligandem, který se váže do aktivního místa, je fumarát (Obrázek 3, část B vlevo)⁴⁰. PDC domény se mohou v sensorových proteinech vyskytovat i v tandemovém uspořádání, například histidinkináza LuxQ obsahuje dvě extracytoplazmatické PDC domény, které detekují přítomnost LuxP proteinu⁴¹. Druhým často zastoupeným typem

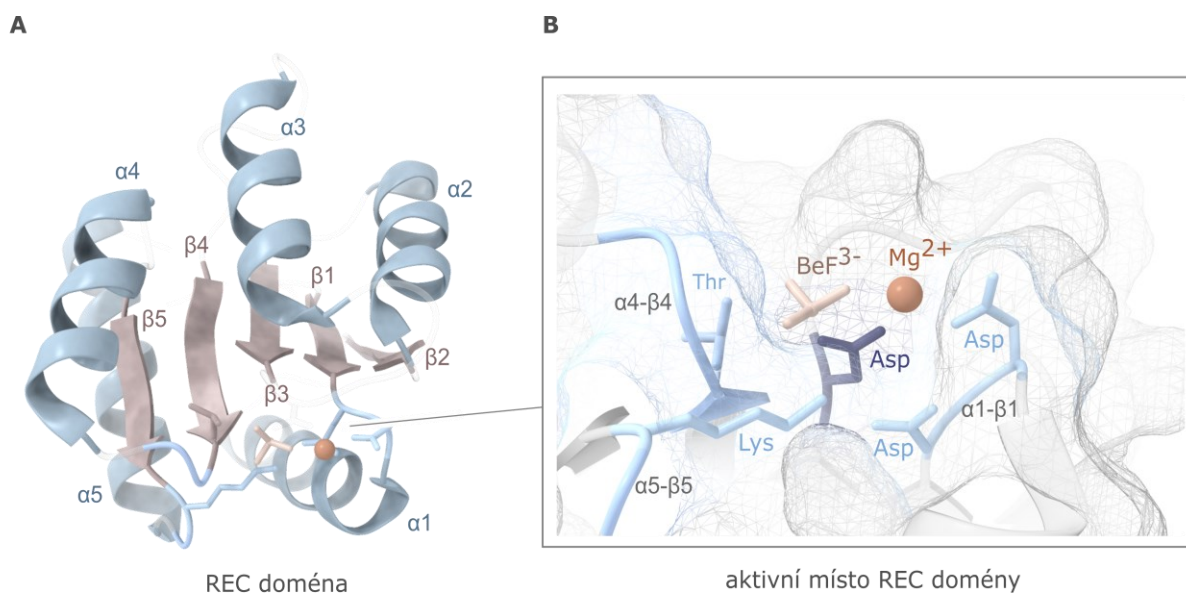
extracelulárních domén jsou α -helikální domény, jež jsou celé tvořeny pouze α -helixy (neobsahují β -listy). Příkladem je histidinkináza NarX *E. coli* (Obrázek 3, část B vpravo, str. 16), jejíž sensorová doména je tvořena svazkem čtyř helixů⁴².

2.1.2 Regulator odpovědi – druhá složka dvoukomponentního signalizačního systému

Druhou složkou dvoukomponentního signalizačního systému bakterií je RR. V nejjednodušším uspořádání je tvořen dvěma doménami, a to konzervovanou N-terminální příjmovou doménou Rec (z angl. receiver domain), která je spojena s variabilní C-terminální efektorovou doménou. Rec doména katalyzuje přenos fosforylové skupiny z příslušné histidinkinázy na aspartátový zbytek RR. Fosforylace aspartátu v Rec doméně vyústí ve změnu konformace, která je šířena až do efektorové domény, čímž způsobí její aktivaci a zajistí tak vyvolání buněčné odpovědi na přijatý signál¹.

2.1.2.1 Rec doména

Struktura Rec domény je tvořena pěti paralelně uspořádanými β -listy (β 1– β 5), kolem kterých je uspořádáno pět α -helixů (α 1– α 5). Listy β 1, β 3 a β 4 se nacházejí v hydrofobním jádře domény a jsou nejvíce konzervovanou strukturou, naopak struktury na povrchu domény (α -helixy a listy β 2 a β 5) se svou strukturou u různých RR liší (Obrázek 4, část A.). Nejvíce konzervované jsou aminokyselinové zbytky, jenž tvoří aktivní místo domény. Jedná se o aspartátový zbytek na konci β 3 listu, na který je přenášena fosforylová skupina z histidinkinázy při fosfotransferázové



Obrázek 4: Rec doména RR. A) Rec doména se skládá z pěti paralelně uspořádaných β -listů (hnědě) umístěných v hydrofobním jádře domény a pěti α -helixů umístěných na povrchu domény (modře). B) Aktivní místo Rec domény je tvořeno aspartátovými zbytky umístěnými na smyčce mezi helixem α 1 a listem β 1, lysinovým zbytkem nacházejícím se mezi helixem α 5 a listem β 5 a threoninovým zbytkem mezi helixem α 4 a listem β 4 (světle modře). Tyto zmíněné aminokyselinové zbytky koordinují hořčičnaté ionty nezbytné pro katalýzu a atomy kyslíku fosforylové skupiny (v tomto případě nahrazena BeF_3^-), která se váže na aspartátový zbytek (tmavě modře) na konci listu β 3. Zobrazeno na RR CheY *E. coli* (PDB: 1FQW). Vytvořeno v programu ChimeraX ver. 1.9.

reakci. Dále je aktivní místo tvořeno aspartátovými zbytky umístěnými na smyčce mezi helixem α_1 a listem β_1 , které koordinují hořečnatý iont nezbytný pro katalýzu. Konzervovaný lysinový zbytek nacházející se mezi helixem α_5 a listem β_5 spolu s threoninovým zbytkem mezi helixem α_4 a listem β_4 koordinují atomy kyslíku fosforylové skupiny⁴³ (Obrázek 4, část B, str. 17).

2.1.2.2 Efektorová doména

Zatímco Rec doména je napříč různými RR konzervovanou strukturou, efektorových domén existuje mnoho druhů a zastávají nejrůznější funkce. Celkem 23 % ze všech doposud objevených RR však efektorovou doménu postrádá a skládá se pouze ze samotných Rec domén⁴⁴. Příkladem je CheY *E. coli* podílející se na regulaci chemotaxe, který má obě domény Rec⁴⁵. RR Spo0F účastníci se sporulace *B. subtilis* je tvořen pouze jedinou Rec doménou⁴⁶. Největší skupina tvořící 66 % všech RR obsahuje jako efektorovou doménu, která je schopná vazby na DNA. Díky struktuře této domény jsou RR schopny se navázat přímo na DNA a fungují jako transkripční regulátory. Dalším typem efektorových domén se zastoupením 8 % jsou ty, které mají enzymovou funkci⁴⁴. Příkladem jsou domény regulující hladiny cyklického di-GMP, jež je rozšířeným druhým poslem v bakteriální signalizaci¹² nebo methylesterázy účastníci se chemotaxe¹³.

2.1.3 Mechanismus přenosu signálu u dvoukomponentních systémů

Jak bylo výše popsáno, hlavní funkcí dvoukomponentních systémů je přijímat signál z okolí a následně ho dále šířit s cílem vyvolání požadované buněčné odpovědi. V posledních letech byly intenzivně studovány molekulární mechanismy, kterými k tomuto šíření signálu dochází, a s každým dalším objasněným mechanismem jsme blíže k pochopení, jak dvoukomponentní systémy fungují. Přenos signálu lze rozdělit na tři základní procesy: jakým způsobem se šíří signál v histidinkináze ze sensorové domény na kinázovou; jakým mechanismem probíhá autofosforylace histidinového zbytku v kinázové doméně, a nakonec jak dochází k přenosu fosforylové skupiny z histidinkinázy na RR⁴⁷.

2.1.3.1 Přenos signálu ze sensorové domény na kinázovou doménu

Většina histidinkináz se vyskytuje ve formě homodimeru. Sensorová doména histidinkinázy obsahuje v místě dimerizace prodloužený helix, který propojuje sensorovou doménu se zbytkem proteinu. V blízkosti prodlouženého helixu se nachází aktivní centrum enzymu, proto konformační změna způsobená navázáním ligandu do aktivního centra pozmění orientaci prodlouženého helixu, čímž je signál šířen do dalších domén histidinkinázy⁴⁸. V případě transmembránových proteinů způsobí změna orientace prodlouženého helixu pozměnění vzájemné polohy transmembránových helixů. Dosud bylo popsáno několik modelů, jakými se

tato změna vzájemné polohy helixů odehrává. Jedná se o pístový posun, při kterém helixy vykonávají pohyb proti sobě, přičemž dva protilehlé helixy se posunují dolů a zbylé dva směrem vzhůru⁴⁹. Další model popisuje změnu orientace helixů tzv. nůžkovým mechanismem, který zahrnuje změnu úhlu, který mezi sebou svírají protilehlé helixy^{50,46}. U histidinkináz, jejichž transmembránová doména je tvořena více procházejícími helixy, probíhá nejčastěji přenos signálu helikální rotací^{51,52}. Jednotlivé modely změny orientace helixů se mezi sebou vzájemně nevylučují, jelikož u některých histidinkináz dochází ke kombinaci těchto mechanismů⁴⁸. Signál může být z transmembránové domény dále šířen přímo na kinázovou doménu, avšak v některých případech mohou být součástí histidinkinázy i další přídavné cytoplazmatické domény, jež navazují na transmembránový úsek proteinu a slouží k signální transdukci. Příkladem takovýchto domén je HAMP doména (název odvozen od skupin proteinů obsahujících tuto doménu: histidinkinázy, adenylylcyklázy, proteiny akceptující methyl a prokaryotické signalizační proteiny)⁵³ či STAC doména (název vytvořen z komponenty asociované s přenašeči rozpustných látek a tuberózním sklerózovým komplexem, z angl. solute carrier protein/tuberous sclerosis complex-associated component)⁵⁴.

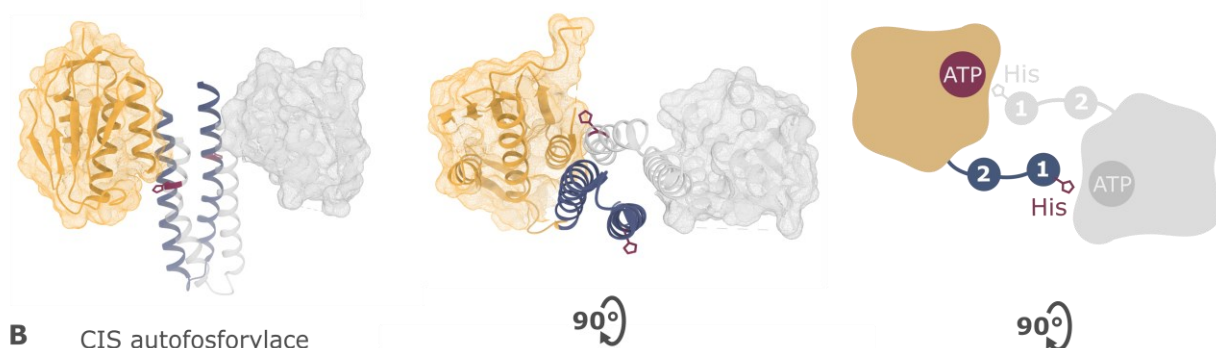
2.1.3.2 Autofosforylace

Poté, co je signál ze sensorové domény přenesen do funkční kinázové domény skrze konformační změny jednotlivých struktur, dochází k vhodnému natočení a přiblížení katalytické domény obsahující vazebné místo pro ATP a dimerizační domény s histidinovým zbytkem. Díky tomu je následně umožněna autofosforylační reakce, při které dochází k přenosu fosforylové skupiny na histidinový zbytek. Většina histidinkináz se až na výjimky vyskytuje ve formě homodimeru⁵⁵, proto přenos fosfátu může probíhat dvěma způsoby, tzv. trans nebo cis mechanismem (Obrázek 5, str. 20).

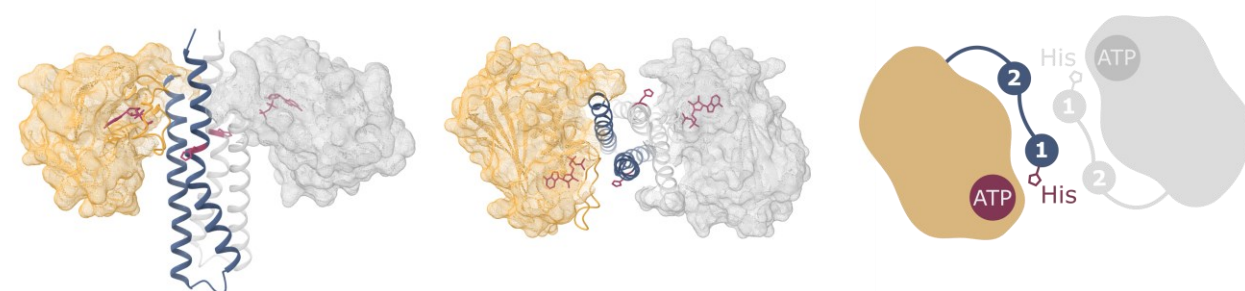
Trans-autofosforylace představuje proces, při kterém katalytická doména z jednoho monomeru katalyzuje fosforylaci histidinového zbytku v dimerizační doméně druhého monomeru. Jak bylo zmíněno, dimerizační rozhraní je tvořeno svazkem čtyř α -helixů, z nichž dva jsou antiparalelní helixy z jednoho monomeru a další dva jsou helixy z druhého monomeru. Vzájemně jsou uspořádány tak, že histidinový zbytek v dimerizační doméně jednoho monomeru míří ke katalytické doméně druhého monomeru, což umožňuje, aby probíhala fosforylace trans mechanismem^{56,57,58}. Zároveň však některé histidinkinázy vykazují i cis mechanismus autofosforylace^{59,60}, při kterém katalytická doména fosforyluje histidinový zbytek v dimerizační doméně monomeru, kterého je sama součástí. O tom, zda bude probíhat autofosforylace trans či cis mechanismem rozhoduje vzájemné uspořádání čtyř helixů v dimerizační doméně.

Určujícím faktorem je, zda je svazek helixů levotočivý, či pravotočivý, což určuje, jak jsou k sobě domény vzájemně orientovány, a zda bude katalytická doména fosforylovat histidin na stejném či vedlejším monomeru. Levotočivý svazek helixů je zodpovědný za cis mechanismus autofosforylace a pravotočivý za trans autofosforylací⁶¹.

A TRANS autofosforylace



B CIS autofosforylace

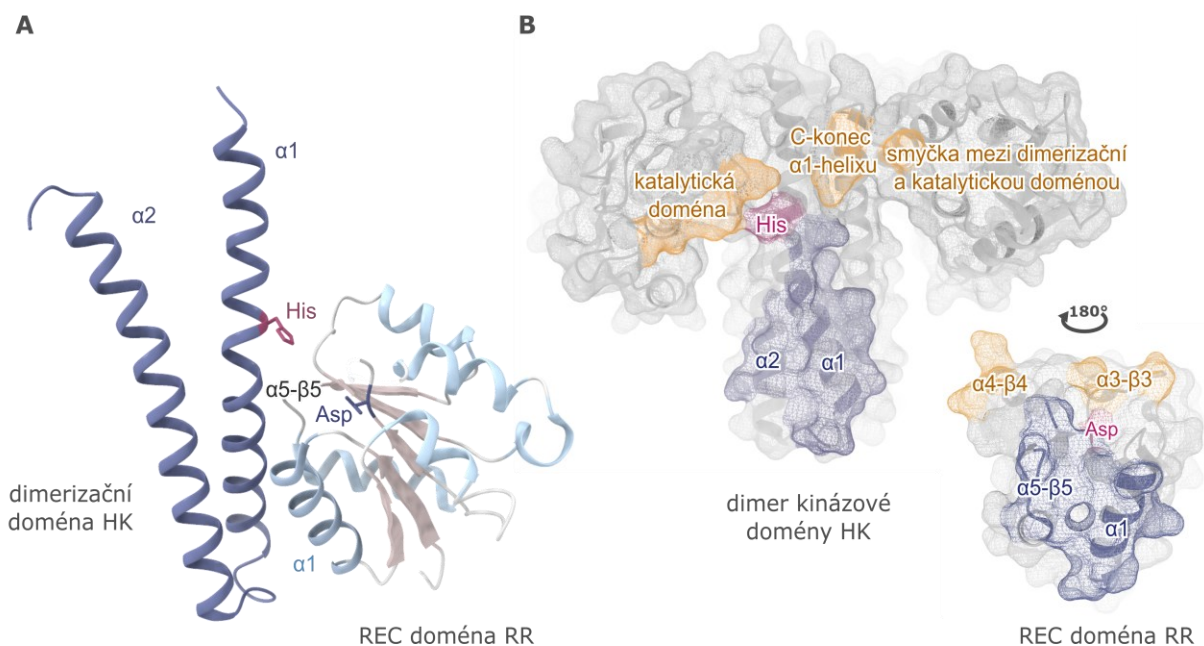


Obrázek 5: Mechanismus autofosforylace histidinkináz. A) TRANS autofosforylace – katalytická doména (žlutá) je orientována vůči dimerizační doméně (modrá) po směru hodinových ručiček, proto je vazebné místo pro ATP jedné podjednotky umístěno v blízkosti histidinového zbytku druhé podjednotky a probíhá tak autofosforylace křížem mezi dvěma podjednotkami homodimeru. Zobrazeno na histidinkináze EnvZ *E. coli* (PDB: 4KP4). B) CIS autofosforylace – katalytická doména (žlutá) je vůči dimerizační doméně (modrá) orientována proti směru hodinových ručiček, což umožní přiblížení vazebného místa pro ATP a histidinového zbytku ze stejné podjednotky homodimeru, a tím pádem probíhá autofosforylace v rámci jedné podjednotky. Zobrazeno na histidinkináze HK853 *T. maritima* (PDB: 3DGE). Vytvořeno v programu ChimeraX ver. 1.9.

2.1.3.3 Přenos fosforylové skupiny na RR

Následujícím krokem signální transdukce dvoukomponentního systému je fosfotransferázová reakce, tedy přenesení fosforylové skupiny z histidinového zbytku kinázové domény histidinkinázy na aspartátový zbytek v Rec doméně RR. Aby se tento krok mohl odehrát, musí dojít k interakci histidinkinázy s RR a k vzájemnému přiblížení histidinového a aspartátového zbytku. Jelikož je tato interakce pouze přechodná, je velmi obtížné zachytit strukturu celkového komplexu s vysokým rozlišením. Proto byla prozatím popsána struktura komplexu histidinkinázy s příslušným RR pouze u několika málo zástupců. Příkladem je komplex histidinkinázy HK853 a RR468 *Thermotoga maritima*⁶² nebo komplex histidinkinázy Spo0F a RR Spo0B *B. subtilis*^{63,64}.

Specifita interakce konkrétního typu histidinkinázy s příslušným RR je zajištěna typem aminokyselinových zbytků, které se nacházejí v místě styku histidinkinázy a RR. Komplex HK853:RR468 *T. maritima* patří do skupiny histidinkináz první třídy slouží jako model pro popis interakcí struktur proteinů ve dvoukomponentních systémech. Hlavní interakce je zprostředkována $\alpha 1$ helixem a smyčkou $\beta 5-\alpha 5$ Rec domény RR, které jsou vloženy mezi dva α -helixy dimerizační domény histidinkinázy. Díky tomu se dostává histidinový a aspartátový zbytek do bezprostřední blízkosti a může tak proběhnout fosfotransferázová reakce (Obrázek 6, část A a B). Další struktury, které se podílí na interakci proteinů jsou smyčky $\beta 3-\alpha 3$ a $\beta 4-\alpha 4$ Rec domény RR, které interagují s katalytickou doménou histidinkinázy. Také spolu interagují struktury C-terminální části dimerizační domény histidinkinázy a propojení dimerizační a katalytické domény druhého monomeru (Obrázek 6, část B)⁶².



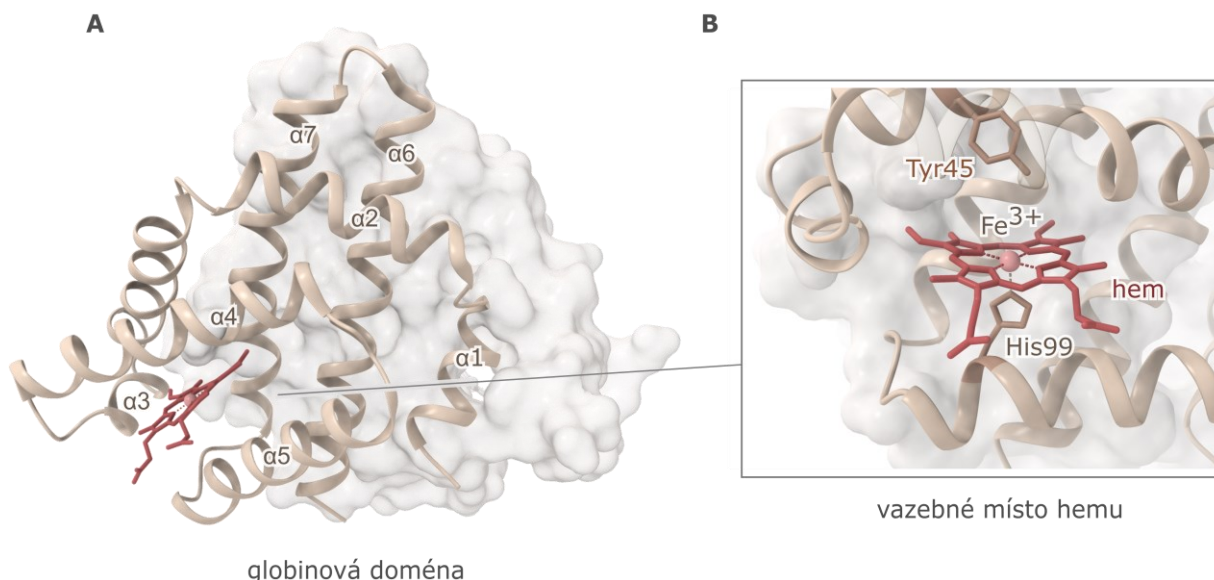
Obrázek 6: Interakce histidinkinázy a RR ve dvoukomponentním signálním systému. A) Hlavní kontakt histidinkinázy a RR je zprostředkován interakcí $\alpha 1$ helixu a $\alpha 5-\beta 5$ smyčky Rec domény RR s α -helixy dimerizační domény HK. Díky tomu je umožněno přiblížení histidinového a aspartátového zbytku, mezi kterými může probíhat fosfotransferázová reakce. PDB: 3DGE. B) Model histidinkinázy HK853 a RR468 *T. maritima*. Na modelu jsou barevně znázorněny kontakty jednotlivých struktur proteinů po utvoření komplexu HK853:RR468. Vytvořeno v programu ChimeraX ver. 1.9 dle⁶².

2.2 Proteinový komplex AfGcHK:RR

Jedním ze zástupců dvoukomponentních signalizačních systémů je komplex histidinkinázy AfGcHK a příslušného RR. AfGcHK je sensorovým proteinem, který detekuje molekuly kyslíku a umožňuje bakterii určit, zda se nachází v aerobním či anaerobním prostředí a podle toho uzpůsobit svůj metabolismus. Molekuly kyslíku jsou detekovány hemem navázaným v globinové sensorové doméně histidinkinázy. Po přijetí signálu dochází k aktivaci histidinkinázy, která vede k autofosforylaci na histidinovém zbytku v kinázové doméně a následně je fosforylová skupina přenesena na příslušný RR. Doposud byly identifikovány histidinkinázy obsahující sensorové domény s navázaným hemem, jakými jsou např. PAS doména či GAF doména, avšak AfGcHK je první identifikovanou histidinkinázou, jejíž sensorová doména obsahující hem je tvořena globinovým motivem².

2.2.1 Struktura AfGcHK a RR

Histidinkináza AfGcHK je tvořena globinovou sensorovou doménou umístěnou na N-konci a kinázovou doménou na C-konci proteinu². Nachází se ve formě dimeru a v monomerní podobě má molekulovou hmotnost 43 kDa^{2,65}. Globinová doména je tvořena sedmi α -helixy (α_1 - α_7) a sedmi smyčkami (S1-S7), sekvenčně se nejvíce blíží globinové doméně sensorového proteinu *Geobacter sulfurreducens* (34% sekvenční podobnost)⁶⁶. Hydrofobní jádro domény je tvořeno helixy α_6 , α_7 a částí helixu α_4 , přičemž helixy α_6 a α_7 se zároveň podílí na tvorbě homodimeru (Obrázek 7, část A, str. 23). Globinová doména je charakteristická svou schopností vázat molekulu hemu. Vazebné místo pro hem je tvořeno helixy α_2 - α_7 , přičemž histidinový zbytek His99 z helixu α_5 vytváří koordinační vazbu s iontem železa hemu na proximální straně a tyrosinový zbytek Tyr45 formuje distální vazebné místo hemu (Obrázek 7, část B, str. 23). Distální vazebné místo hemu je tvořeno helixem α_3 spolu se smyčkami S3 a S4 a představují nejvíce flexibilní strukturu domény. Právě vysoká flexibilita tohoto úseku umožňuje navázání molekuly plynu na iont železa z distální strany⁶⁶. Schopnost vázat molekuly plynu je však závislá na redoxním stavu iontu železa v hemu. Pokud se iont železa nachází v Fe^{3+} -OH⁻ formě, utváří 6-koordinovaný nízko-spinový komplex, kde jsou axiálními ligandy His99 na proximální straně a molekula vody nebo OH⁻ iont na distální straně (s molekulou vody či OH⁻ iontem interaguje zmíněný Tyr45). Pokud je však iont železa redukován do stavu Fe^{2+} , dochází k utvoření 5-koordinovaného vysoko-spinového komplexu, přičemž jako axiální ligand zůstává navázaný pouze His99. V tomto stavu je možné, aby roli axiálního ligandu z distální strany zaujala právě molekula plynu, konkrétně kyslíku či oxidu uhelnatého (Obrázek 8, str. 25)².



Obrázek 7: Struktura globinové sensorové domény proteinu AfGcHK. A) Sensorová doména proteinu AfGcHK je tvořena globinovým motivem, který se skládá ze sedmi α -helixů ($\alpha 1$ – $\alpha 7$). Helixy $\alpha 6$ a $\alpha 7$ se podílejí na tvorbě homodimeru a mezi helixy $\alpha 3$, $\alpha 4$ a $\alpha 5$ se nachází vazebné místo pro hem. B) Molekula hemu je v aktivním místě navázána koordinační vazbou mezi iontem železa a aminokyselinovými zbytky His99 na proximální straně a Tyr45 na distální straně (PDB: 5OHE). Vytvořeno v programu ChimeraX ver. 1.9.

Strukturu celé histidinkinázy se doposud nepodařilo přímými metodami odhalit. Na základě homologního modelování spojeného metodou vodíko-deuteriové výměny následovanou hmotnostní spektrometrií (HDX-MS) je pravděpodobně globinová doména spojena s kinázovou doménou dlouhou a velmi flexibilní smyčkou, která je plně přístupná rozpouštědлу a má nestrukturovaný charakter⁶⁵. Kinázová doména je tvořena, podobně jako tomu je i u dalších histidinkináz (kapitola 2.1.1, str. 13), dvěma subdoménami, a to katalytickou a dimerizační doménou. Katalytickou doménu celkově tvoří tři α -helixy $\alpha 10$ – $\alpha 12$ a pět β -listů $\beta 1$ – $\beta 5$, přičemž helix $\alpha 11$ je umístěn v hydrofobním centru a vytváří vazebné místo pro ATP. Dimerizační doména je tvořena dvěma helixy $\alpha 8$ a $\alpha 9$ propojenými smyčkou, přičemž na helixu $\alpha 8$ se nachází histidinový zbytek H183, na který je přenášena fosforylová skupina v rámci autofosforylační reakce histidinkinázy. Jak vyplývá z názvu domény, helixy $\alpha 8$ a $\alpha 9$ se podílejí na formování dimeru histidinkinázy tím, že vytvářejí svazek čtyř helixů spolu s dvěma helixy druhého monomeru⁶⁵.

2.2.1.1 Dimerizační rozhraní AfGcHK

Kromě dimerizační domény se na formaci dimeru AfGcHK podílí i globinová sensorová doména svými $\alpha 6$ a $\alpha 7$ helixy. Dimerizační rozhraní globinové domény lze rozdělit na dvě části. První část vyskytující se v místě vzdálenějším od kinázové domény, zahrnuje především van der

Waalsovy interakce a vodíkové vazby zprostředkované molekulami vody. Druhá část, která je umístěna blíže kinázové doméně, je tvořena přímými vodíkovými vazbami mezi atomy aminokyselinových zbytků dvou monomerů histidinkinázy, dále hydrofobními interakcemi a také vodíkovými vazbami zprostředkovanými molekulami vody. První a vzdálenější část je díky celkově slabším interakcím flexibilnější než část druhá, a proto v ní mohou probíhat větší strukturní změny při přechodu mezi jednotlivými konformačními stavy proteinu⁶⁶. Při porovnání krystalových struktur dimeru a monomeru samotné globinové domény lze pozorovat strukturní změny v uspořádání helixů α_1 , α_6 a α_7 . Ve formě homodimeru se nachází tyrosinový zbytek Tyr15 v helixu α_1 v takové pozici, že je zanořen do vazebného místa obsahující hem v druhém monomeru. Avšak pokud je globinová doména ve formě monomeru, torzní úhel Tyr15 je pozměněn a dochází k jeho oddálení od vazebného místa druhého monomeru. Spolu s tím dochází i k relaxaci a změně pozice celých helixů α_1 , α_6 a α_7 . Důležitou roli Tyr15 v tvorbě homodimeru potvrdily i mutační studie, ze kterých vyplývá neschopnost vytvořit dimer globinové domény bez zmíněného tyrosinového zbytku. Toto ovšem neplatí v případě celkové histidinkinázy, která tvoří homodimer i s mutovaným Tyr15, pravděpodobně kvůli dodatečným interakcím kinázových podjednotek monomerů, ačkoliv této podobě není enzymově aktivní⁶⁶.

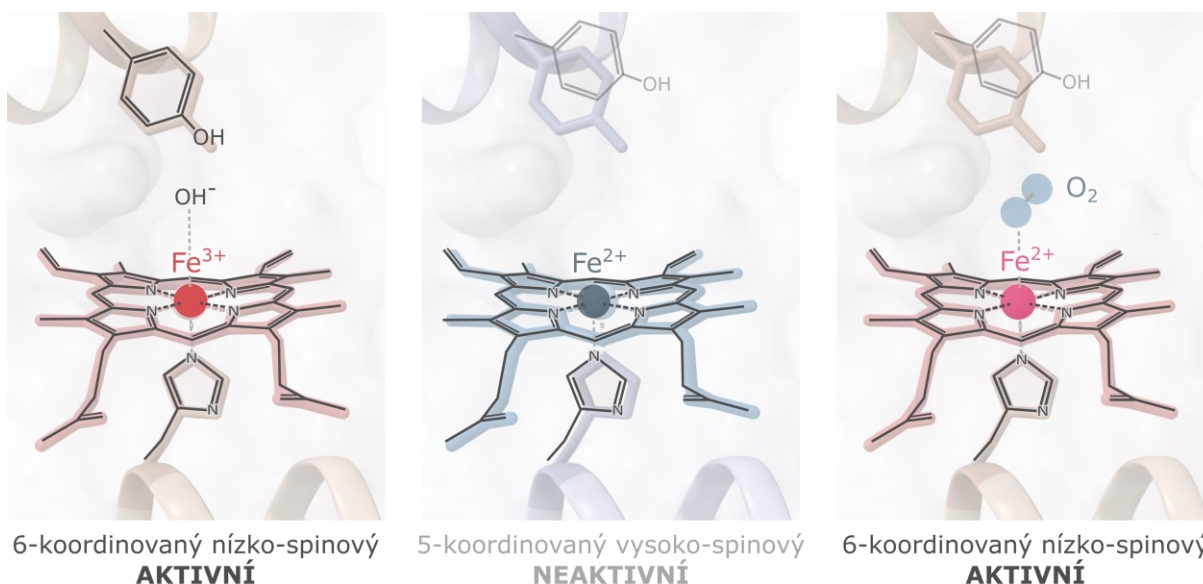
K histidinkináze AfGcHK přísluší RR, který se skládá ze dvou Rec domén (Rec1 a Rec2)² a nachází se ve formě monomeru s molekulovou hmotností 27 kDa. Jednotlivé domény strukturou odpovídají obecné organizaci Rec domény (kapitola 2.1.2, str. 17). Celkem je RR tvořen devíti α -helixy (α_1 – α_9) a deseti β -listy (β_1 – β_{10}), které jsou propojeny dvaceti smyčkami (S1–S20), přičemž smyčka S11 propojuje doménu Rec1 s doménou Rec2⁶⁵.

2.2.2 Přenos signálu v komplexu AfGcHK:RR

Komplex AfGcHK:RR představuje signalizační systém, který umožňuje bakteriím rozpoznat, zda se nacházejí v prostředí s dostatkem kyslíku, a na základě toho mohou přizpůsobit své metabolické pochody. Přenos signálu mezi těmito dvěma komponentami probíhá následujícím způsobem. Nejprve dochází k aktivaci histidinkinázy v sensorové doméně, přičemž aktivní podobou proteinu je forma s navázaným Fe^{3+} iontem v hemu a také forma s Fe^{2+} s navázanou molekulou kyslíku či oxidu uhelnatého². Aktivace histidinkinázy vede k autofosforylační reakci, při které je na histidinový zbytek His183 v dimerizační doméně přenesena fosforylová skupina z katalytické domény. Následně dochází k přenosu fosforylové skupiny z AfGcHK na RR, který obsahuje dva aspartátové zbytky, jenž mohou být fosforylovány. Jedná se o Asp52 v Rec1 doméně a Asp169 v Rec2 doméně (Obrázek 9, str. 26). Byly identifikovány celkem tři fosforylované formy RR – monofosforylovaná forma s fosfátem na Asp52, dále druhá monofosforylovaná forma

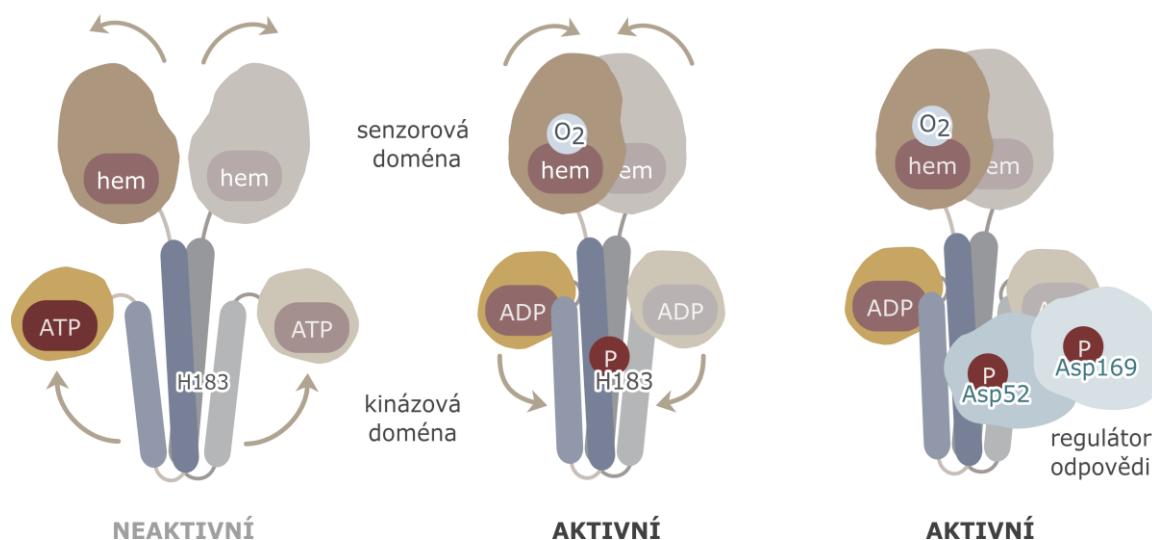
s fosfátem na Asp169 a také difosforylovaná forma s fosfáty na obou zmíněných aspartátových zbytcích. Doposud není zcela objasněno, v jakém pořadí a jakým mechanismem dochází k fosfotransferázové reakci z AfGcHK na RR².

Jak bylo výše zmíněno, aktivita AfGcHK je závislá na koordinační struktuře hemu. Pokud se iont železa hemu nachází v $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}^-$ formě (iont železa je 6-koordinovaný), je histidinkináza aktivní a může dojít k autofosforylační a fosfotransferázové reakci. Je-li však iont železa v hemu redukován na Fe^{2+} (iont železa je 5-koordinovaný), enzym se stává neaktivním, avšak v této podobě je schopen navázat molekulu kyslíku či oxidu uhelnatého, která pozmění koordinační strukturu hemu (iont železa se opět stává 6-koordinovaný) a dojde k opětovné aktivaci histidinkinázy (Obrázek 8)². Enzym je také aktivní v případě navázání dalších ligandů na iont železa, jedná se například o formy $\text{Fe}^{3+}\text{-CN}^-$, $\text{Fe}^{3+}\text{-imidazol}$ ⁶⁷ a $\text{Fe}^{3+}\text{-SH}$ ⁶⁸. Přítomnost samotného hemu jako takového je také nezbytně nutná pro zachování aktivity enzymu⁶⁷. Studie histidinkinázy obsahující komplex protoporfyrinu IX, ve kterém byl iont železa substituován iontem kobaltu, ukázala, že ještě více než na koordinační struktuře hemu závisí na spinovém stavu příslušného iontu kovu. Pokud je iont kovu v nízko-spinovém stavu (formy $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}^-$, $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$, $\text{Co}^{3+}\text{-OH}^-$ a $\text{Co}^{2+}\text{-O}_2$) je AfGcHK aktivní, a naopak ve vysoko-spinovém stavu (Fe^{2+} forma) je enzym neaktivní⁶⁹.



Obrázek 8: Schéma vazebného místa sensorové domény AfGcHK. Pokud se iont železa nachází v $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}^-$ formě, která je 6-koordinovaná a vysoko-spinová, dochází k aktivaci enzymu. Naopak v Fe^{2+} (5-koordinované, vysoko-spinové) je enzym neaktivní, avšak po navázání molekuly kyslíku se železnatý iont stává 6-koordinovaným nízko-spinovým, což vede k opětovné aktivaci enzymu. Vytvořeno v programech ChimeraX ver 1.9.

Při přechodu z neaktivní do aktivní formy enzymu AfGcHK dochází k pozměnění struktury. Dle studií HDX-MS probíhá při přechodu do neaktivní formy v histidinkináze pohyb podobný otevírání nůžek, při kterém pravděpodobně dochází k oddálení sensorových domén jednotlivých monomerů od sebe, a zároveň probíhá i oddálení katalytické domény od dimerizační domény ve funkční kinázové doméně⁶⁶ (Obrázek 9). Tento pohyb sensorových domén může být způsoben změnami v dimerizačním rozhraní sensorové domény. Jak bylo výše zmíněno (kapitola 2.2.1, str. 22), pro vytvoření dimeru sensorové domény je nezbytně nutný Tyr15. Pokud je tyrosinový zbytek mutovaný za jiný alifatický aminokyselinový zbytek, sensorová doména není schopna vytvořit homodimer a navíc absence Tyr15 v celé histidinkináze způsobí její deaktivaci. Proto byl navržen následující model signální transdukce v AfGcHK. Přijetí signálu sensorovou doménou (navázání molekuly plynu na hem) má za následek změny v uspořádání dimerizačního rozhraní sensorové domény, které zahrnuje přiblížení sensorových domén. Tato změna struktury je následně dále šířena do funkční kinázové domény, ve které dochází k přiblížení katalytické domény k dimerizační doméně, což umožní proběhnutí autofosforylační reakce⁷⁰.



Obrázek 9: Schéma nůžkového pohybu domén histidinkinázy AfGcHK při přechodu z neaktivní do aktivní formy. V neaktivní formě jsou od sebe sensorové domény jednotlivých monomerů oddáleny, a zároveň katalytická doména je oddálena od dimerizační domény. Pokud dojde k aktivaci enzymu navázáním molekuly kyslíku, dochází k přiblížení sensorových domén, což vyústí v šíření signálu do kinázové domény vedoucí k přiblížení katalytické domény k dimerizační doméně. Díky přiblížení ATP k histidinovému zbytku H183 je umožněna autofosforylační reakce. Fosforylová skupina je následně přenesena na aspartátové zbytky RR.

Komplex AfGcHK:RR je tvořen homodimerem AfGcHK, na který je navázán pouze jediný monomerní RR⁶⁵. Z experimentů HDX-MS vyplývá, že RR je v kontaktu s AfGcHK pouze svou Rec1 doménou, konkrétně $\alpha 1$ helix RR interaguje s N koncem $\alpha 9$ helixu AfGcHK a $\alpha 5$ helix RR interaguje s C koncem $\alpha 8$ helixu AfGcHK⁶⁵. Přesto, že RR interaguje s AfGcHK pouze svojí Rec1

doménou, dochází k fosforylaci aspartátových zbytků jak v Rec1 doméně, tak i v Rec2 doméně. Je možné, že Rec1 doména má vyšší afinitu k AfGcHK než Rec2 doména, což by odpovídalo preferenční fosforylaci Asp52 v Rec1 doméně při krátkých inkubačních časech². Zároveň je možné, že fosforylace Asp52 vyvolá změnu struktury RR, což umožní lepší přístup Rec2 domény k AfGcHK⁶⁵.

3 CÍLE PRÁCE

Cíle předkládané diplomové práce jsou následující:

- příprava rekombinantních proteinů *AfGcHK* a *RR* s navázanou histidinovou kotvou (His tag) a proteinu *AfGcHK* s kotvou tvořenou proteinem vázajícím maltózu (MBP tag, z angl. maltose-binding protein)
- ověření enzymové aktivity komplexu *AfGcHK:RR* zahrnující autofosforylační reakci v *AfGcHK* následovanou fosfotransferázovou reakcí z *AfGcHK* na *RR*
- vytvoření teoretického modelu komplexu *AfGcHK:RR* v programu AlphaFold3 pro následné porovnání s experimentálním modelem komplexu
- určení struktury proteinového komplexu *AfGcHK:RR* pomocí kryoelektronové mikroskopie s cílem identifikovat způsob interakce mezi *AfGcHK* a *RR*, a z toho vyplývající mechanismus fosfotransferázové reakce
- určení struktury homodimeru *AfGcHK-MBP tag* pomocí kryoelektronové mikroskopie s cílem identifikovat strukturu celé histidinkinázy *AfGcHK*

4 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

4.1 Použité chemikálie

2-merkптоethanol	Fluka (Švýcarsko)
3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]- -1-propansulfonát (CHAPSO)	Sigma-Aldrich (USA)
adenosintrifosfát (ATP)	Sigma-Aldrich (USA)
akrylamid	Fluka (Švýcarsko)
ampicilin	Roche (Švýcarsko)
Amylose resin	New England BioLab (USA)
Bacto Tryptone	Oxoid (USA)
Bacto Yeast Extract	Oxoid (USA)
bromfenolová modř	Lachema (Česká republika)
chlorid draselný	Lach-ner (Česká republika)
chlorid hořečnatý	Lach-ner (Česká republika)
chlorid sodný	Lach-ner (Česká republika)
dihydrogenfosforečnan draselný	Lach-ner (Česká republika)
dimethylsulfoxid (DMSO)	Lach-ner (Česká republika)
dodecylsíran sodný (SDS)	Fluka (Švýcarsko)
fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva (Německo)
glycerol	Lach-ner (Česká republika)
glycin	Penta (Česká republika)
hemin	Sigma-Aldrich (USA)
hydrogenfosforečnan draselný	Lach-ner (Česká republika)
InstantBlue Protein Stain	Expedeon (Velká Británie)
imidazol	Lachema (Česká republika)

isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich (USA)
kmen BL-21 (DE3) <i>E. coli</i>	Stratagen (USA)
kyselina chlorovodíková	Lach-ner (Česká republika)
kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	Lachema (Česká republika)
Luria-Bertani Broth (LB médium)	Carl Roth (Německo)
Luria-Bertani Agar (LB agar)	Carl Roth (Německo)
lysosym	Fluka (Švýcarsko)
N,N'-metylen-bis-akrylamid (BIS)	Fluka (Švýcarsko)
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich (USA)
peroxidisíran amonný	Lachema (Česká republika)
plasmidy:	laboratoř prof. Toru Shimizu, PhD., Univerzita Tohoku v Sendai, Japonsko
pET-21c(+)/AfGcHK-His tag	
pET-21c(+)/RR-His tag	
pMal-c5e/AfGcHK-MBP tag	
Precision Plus Protein Unstained Standard	Bio-Rad (USA)
TALON Superflow	GE Healthcare (USA)
tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Fluka (Švýcarsko)
uranylacetát	EM Sciences (USA)

4.2 Použité přístroje

analytické váhy	ER-120A, A&D
autoklávy	Microjet, Enbio Technology MLS-3781L, PHCbi
centrifugační filtr	Amicon Ultra, Merck Millipore
centrifugy	Allegra X-30R, Beckman Coulter Avanti JXN-26, Beckman Coulter
elektroforetická aparatura	Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad
elektronový mikroskop	JEM-2100Plus, JEOL
filtr	Millipore Express PLUS 0,22 μm , Merck
chromatografická kolona	Superdex 200 increase 10/300 GL, GE Healthcare
chromatografická kolona s fritou	Econo-Column, Bio-Rad
chromatografický systém	ÄKTaprime plus, GE Healthcare
inkubátory	Mini Dry Bath, MD-MINI, Major Science ES-60 Incubator Shaker, MIULab IB-01E, Schoeller Instruments
kahan	Gasprofi 2 SCS, WLD-TEC
kamera	TemCam-XF416 4K CMOS, TVIPS
křemenná kyveta	High Precesion Cell, Quartz Suprasil, Hellma Analytics
laboratorní váhy	440-35N, KERN HM-200, A&D Instruments
laminární box	BIO 126, Labox
magnetická míchačka	C-MAG MS 7, IKA VARIOMAG Electronicrührer MONO, H + P Labortechnik
mrazicí komora	Vitrobot Mark IV, Thermo Fisher Scientific
mřížky pro kryoelektronovou mikroskopii	karbonová Cu mřížka (300 mesh, 2 μm), UltraAuFoil (R 1,2/1,3, 300 mesh) Quantifoil
PELCO Glow Discharge systém	PELCO easiGlow, Ted Pella Inc.

rotační třepačka	Chemos Group
skener	Perfection V550 Photo, Epson
spektrofotometry	Cary 60, UV-VIS, Agilent Technologies DS-11, DeNovix
stolní centrifuga	Mini centrifuge C1301, Labnet
třepačka	Multritron Pro, Infors HT
ultracentrifuga	Optima XPN-90 Ultracentrifuge, Beckman Coulter
ultrazvukový homogenizátor	Sonopuls HD 3100, sonda KE 76, Bandelin
vortex	MS1 Minishaker, IKA

5 METODY

5.1 Příprava rekombinantních proteinů AfGCHK-His tag, AfGCHK-MBP tag a RR-His tag

5.1.1 Příprava agarových ploten pro kultivaci buněk

Roztok LB agaru o koncentraci 40 g/l byl nejprve sterilizován v mikrovlnném autoklávu (Microjet, Enbio Technology) při 121 °C po dobu 20 minut a poté byl temperován na teplotu přibližně 50 °C. Následně byl v laminárním boxu (BIO 126, Labox) roztok LB agaru převeden do sterilní zkumavky Falcon a bylo do něj přidáno antibiotikum ampicilin tak, aby výsledná koncentrace ampicilinu v roztoku činila 100 µg/ml. Výsledná směs byla ve zkumavce promíchána a převedena na sterilní Petriho misky v množství 10 ml roztoku na jednu misku. Misky s LB agarem byly ponechány v laminárním boxu při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny.

5.1.2 Transformace buněk *E. coli* BL-21 (DE3) a jejich následná kultivace

Zmražené buňky *E. coli* BL-21 (DE3) spolu s plasmidy pET-21c(+)/AfGCHK-His tag (118 ng/µl), pMal-c5e/AfGCHK-MBP tag (113 ng/µl) a pET-21c(+)/RR-His tag (128 ng/µl) byly ponechány temperovat na ledu při laboratorní teplotě. V laminárním boxu (BIO 126, Labox) byla suspenze buněk *E. coli* BL-21 (DE3) převedena do čtyř sterilních mikrozkuvek Eppendorf po 25 µl. Dále bylo k suspenzi buněk přidáno 5 µl příslušného plasmidu tak, aby každá mikrozkuvka obsahovala buňky a jeden typ plasmidu. Do poslední mikrozkuvky nebyl k suspenzi buněk přidán žádný z plasmidů, a tudíž sloužila jako kontrola. Obsah mikrozkuvek byl promíchán a výsledné suspenze byly ponechány v mikrozkuvkách na ledě po dobu 30 minut. Poté byl proveden teplotní šok, a to inkubací suspenze buněk v termostatu při 42 °C po dobu 45 sekund (myBlock, Mini Dry Bath, Benchmark) a následným ochlazením směsi na ledu po dobu 5 minut.

Do připravené suspenze buněk s plasmidy (v případě kontroly bez plasmidu), jež prošly teplotním šokem, bylo v laminárním boxu přidáno 250 µl LB média (koncentrace 25 g/l, předem sterilizováno v autoklávu Microjet, Enbio Technology při teplotě 121 °C po dobu 20 min). Směs byla promíchána a ponechána inkubovat při 37 °C po dobu 60 minut (ES-60 Incubator Shaker, MIULab). Po uplynutí této doby byla směs z mikrozkuvek převedena na připravené plotny obsahující LB agar a ampicilin a následně byla sterilní hokejkou rovnoměrně rozprostřena po celé ploše. Po vsáknutí roztoku do agaru byly Petriho misky uzavřeny víkem, zajištěny parafilmem a dnem vzhůru inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 18 h (IB-01E, Schoeller Instruments). Po inkubaci byly plotny s transformovanými buňkami uchovány v chladničce pro další použití.

5.1.3 Exprese proteinů AfGCHK-His tag, AfGCHK-MBP tag a RR-His tag

Pro expresi zmíněných proteinů byla použita vždy pouze jedna kolonie transformovaných buněk *E. coli* BL-21 (DE3) (kapitola 5.1.2, str. 33). Od každého typu plasmidu byla vybrána izolovaná kolonie buněk a v laminárním boxu byla sterilním párátkem přenesena do sterilní zkumavky typu Falcon obsahující 5 ml roztoku LB média (25 g/l, předem sterilizováno v autoklávu Microjet, Enbio Technology při teplotě 121 °C po dobu 20 min) a 5 µl ampicilinu (o výsledné koncentraci 100 µg/ml). Připravená směs byla inkubována při 37 °C a 200 otáčkách za minutu (RPM, z angl. revolutions per minute) po dobu 18 hodin (ES-60 Incubator Shaker, MIULab).

V dalším kroku byly připravené buněčné kultury přeneseny a kultivovány v Terrific Broth médiu (TB médium). Toto médium bylo připraveno smícháním Bacto Yeast Extract o výsledné koncentraci 24 g/l a Bacto Tryptone o výsledné koncentraci 12 g/l, poté bylo převedeno po 500 ml do velkých Erlenmeyerových baněk, jejichž hrdlo bylo uzavřeno alobalem. Tato směs byla následně sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut (MLS-3781L, PHCbi) a poté k ní byl přidán předem přefiltrovaný roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (o výsledné koncentraci 0,017 M), hydrogenfosforečnanu draselného (o výsledné koncentraci 0,072 M) a glycerolu (o výsledné koncentraci 0,4 % (v/v)). Do každé baňky obsahující 500 ml sterilního TB média bylo následně přidáno 500 µl ampicilinu (výsledná koncentrace 100 µg/ml) a také 250 µl buněčné kultury transformované příslušnými plasmidy (kapitola 5.1.2, str. 33 a předchozí odstavec). Výsledná suspenze byla inkubována na třepačce (Multriton Pro, Infors HT) při 37 °C a 180 RPM do okamžiku, kdy se optická densita roztoku při vlnové délce 600 nm pohybovala v rozmezí 0,6 až 1,2 (Cary 60, UV-VIS, Agilent Technologies). Po dosažení těchto hodnot byla snížena teplota na 15 °C a otáčky na 140 RPM. Následně byla v buňkách indukována exprese genů pro příslušné rekombinantní proteiny přidáním 100 µl isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG) o výsledné koncentraci 0,1 mM. Takto připravené buněčné kultury s aktivní expresí příslušného proteinu byly inkubovány při 15 °C, 140 RPM po dobu 20 hodin (Multriton Pro, Infors HT).

Na závěr byly buněčné suspenze podrobeny centrifugací při 4 °C, 6 500 RPM, po dobu 20 minut (Optima XPN-90 Ultracentrifuge, Beckman Coulter). Vytvořená buněčná peleta byla převedena do zkumavky typu Falcon, určena její hmotnost pro výpočet hodnoty výtěžku buněk (ER-120A, A&D) a uchována při teplotě -80 °C pro další použití.

5.1.4 Izolace proteinů AfGcHK-His tag, AfGcHK-MBP tag a RR-His tag

Připravené buněčné kultury obsahující příslušné proteiny byly ponechány rozmraznout při laboratorní teplotě a následně resuspendovány pufrům v poměru 1:4 (buňky:resuspendační pufr) obsahujícím 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM chloridu sodného, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF a 0,2 mg/ml lysosymu. Výsledná resuspendovaná buněčná suspenze byla převedena do kádinky, umístěna na led a za stálého míchání na magnetické míchačce (C-MAG MS 7, IKA) byly buňky následně rozrušeny ultrasonikací (Sonopuls HD 3100, sonda KE 76, Bandelin). Ultrasonikace buněk byla prováděna s amplitudou 55 %, v šesti minutových intervalech přerušovaných 45s přestávkami.

Dále byl do buněčného homogenizátu přidán 5 mM roztok heminu v DMSO v takovém množství, aby jeho výsledná koncentrace činila 300 μ M. Za stálého míchání na magnetické míchačce (VARIOMAG Electronicrührer MONO, H + P Labortechnik) byla připravená směs inkubována v chladové místnosti při 4 °C po dobu 20 minut. Po dokončení inkubace s heminem byla provedena centrifugace (ultracentrifuga Optima XPN-90 Ultracentrifuge, rotor 70 Ti, Beckman Coulter) při 4 °C, 55 000 RPM po dobu 70 minut. Po ultracentrifugaci bylo ze supernatantu odebráno 100 μ l vzorku pro pozdější provedení diskontinuální elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE, z angl. sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) (vzorek č. 1, kapitola 5.3).

V následujícím kroku byla použita afinitní chromatografie pro selekci připravovaných proteinů. Jako afinitní nosič pro proteiny s histidinovou kotvou (AfGcHK-His tag, RR-His tag) byl použit TALON SuperFlow (GE Healthcare) a pro protein s MBP kotvou (AfGcHK-MBP tag) byl použit Amylose Resin (New England BioLabs). Oba typy afinitních nosičů byly nejdříve ekvilibrovány pufrům A obsahujícím 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) a 100 mM NaCl. Proces ekvibrace zahrnoval důkladné promíchání nosiče a převedení 3 ml suspenze daného afinitního nosiče do zkumavky typu Falcon. Následně byla provedena centrifugace při 4 °C a 200 RPM po dobu 2 minut (Allegra X-30R Centrifuge, rotor SX4400 s poloměrem 10,1 cm, Beckman Coulter). Oddělený supernatant byl odebrán a do zkumavky bylo přidáno takové množství pufru A, aby byl s nosičem v poměru 1:1, v tomto případě 1,5 ml. Celý proces centrifugace, odstranění supernatantu a přidání pufru A byl opakován celkem třikrát. Takto ekvilibrovaný afinitní nosič byl smíchán se supernatantem obsahujícím příslušný izolovaný protein a inkubován při 4 °C za stálého míchání na rotační třepačce (Chemos Group) po dobu 1 hodiny. Po skončení inkubace byla směs aplikována na chromatografickou kolonu s fritou (Econo-Column, Bio-Rad), která byla předem promyta deionizovanou vodou. Z proteklého eluátu bylo odebráno dalších 100 μ l vzorku

na SDS-PAGE elektroforézu (vzorek č. 2, kapitola 5.3). Následně byla kolona promyta 50 ml pufru A a poté byly proteiny eluovány 15 ml elučního pufru. V případě proteinů s histidinovou kotvou obsahoval eluční pufr 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM chloridu sodného a 200 mM imidazolu; pro proteiny s MBP tagem eluční pufr obsahoval 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM chloridu sodného a 10 mM maltózy. Z výsledného eluátu obsahující příslušné proteiny AfGcHK-His tag/MBP tag či RR-His tag bylo odebráno 100 μ l vzorku pro SDS-PAGE elektroforézu (vzorek č. 3, kapitola 5.3).

V dalším kroku bylo potřeba eluát z afinitní chromatografie o objemu 15 ml zakoncentrovat. Odebraný eluát byl převeden do kyvet s centrifugačním filtrem (Amicon Ultra, Merck Millipore), jejichž typ byl zvolen podle molekulové hmotnosti proteinů. Pro AfGcHK-His tag a AfGcHK-MBP tag byly použity filtry Amicon, které nepropouští látky větší 30 kDa a pro protein RR-His tag byly použity filtry s limitem 10 kDa. Roztok v kyvetách byl centrifugován při 4 °C a 4 000 RPM po dobu 2 minut (Allegra X-30R Centrifuge, rotor SX4400 s poloměrem 10,1 cm, Beckman Coulter) a poté byl promíchán. Tento cyklus byl opakován, dokud nebyl roztok proteinu zakoncentrován na konečný objem 500 μ l.

Finálním separačním krokem bylo provedení gelové permeační chromatografie (chromatografický systém ÄKTAprime plus, kolona Superdex 200 increase 10/300 GL, GE Healthcare). Nejdříve bylo potřebné před samotnou separací vykonat přípravu. Všechny roztoky používané jako mobilní fáze byly sterilizovány v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut (MLS-3781L, PHCbi) a přefiltrovány (Millipore Express PLUS 0,22 μ m, Merck). Následně byl promyt systém hadiček, nástřikové smyčky a sběrače frakcí deionizovanou vodou a poté roztokem mobilní fáze obsahující 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) a 150 mM chloridu sodného. Dále byla nasazena a promyta kolona (Superdex 200 increase 10/300 GL, GE Healthcare) přibližně 50 ml mobilní fáze s průtokem 0,2 ml/min a tlakem 1 MPa. Příprava byla završena filtrací roztoku proteinu přes filtr s membránou o velikosti pórů 0,22 μ m (Millipore Express PLUS 0,22 μ m, Merck). Vzorek proteinu o objemu 500 μ l byl přes nástřikovou smyčku vpraven na kolonu, průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min a hodnota tlaku se pohybovala kolem 1 MPa. Po celý proces chromatografie byly zaznamenávány hodnoty absorbance při vlnové délce 280 nm, v bodě nejvyšších naměřených hodnot absorbance byly sbírány jednotlivé frakce eluátu o objemu 0,5 ml. Tyto frakce obsahující izolovaný protein byly po ukončení chromatografie sloučeny a následně opět zakoncentrovány v kyvetách s centrifugačním filtrem (Amicon Ultra, Merck Millipore) na finální objem 250 μ l (postup totožný jako při zakoncentrovávání proteinu po afinitní chromatografii, viz strana 35). Na závěr byl výsledný roztok obsahující proteiny

rozdělen na alikvóty o objemu 5 či 10 μl , které byly zamraženy v kapalném dusíku a poté uchovány v mrazáku při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. V případě proteinu AfGcHK-MBP tag byly frakce obsahující protein detekovány vizuálně, jelikož nebyl dostupný záznam z detekčního zařízení. U těchto frakcí byla změřena koncentrace a frakce s nejvyšší koncentrací byla odebrána a ihned použita pro přípravu preparátu na kryoelektronovou mikroskopii.

5.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů AfGcHK-His tag, AfGcHK-MBP tag a RR-His tag

Pro stanovení koncentrace příslušného proteinu v roztoku finálního preparátu bylo využito spektrofotometrické stanovení absorbance proteinů při vlnové délce 280 nm na spektrofotometru DS-11, DeNovix za použití metody „Protein A280“. Jako blank byla použita mobilní fáze z gelové permeační chromatografie obsahující 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) a 150 mM chloridu sodného. Poté byl na detekční plochu přístroje nanesen vzorek roztoku proteinu o objemu 2 μl a byla změřena jeho absorbance. Z naměřených hodnot absorbance při vlnové délce 280 nm byla vypočítána koncentrace proteinu dle Lambert-Beerova zákona:

$$c_{prot} = \frac{A_{280}}{\varepsilon_{280} \cdot l} \cdot M,$$

kde c_{prot} představuje hmotnostní koncentraci proteinu (mg/ml), A_{280} je absorbance roztoku při vlnové délce 280 nm, ε_{280} značí molární absorpční koeficient při vlnové délce 280 nm ($\varepsilon_{280-AfGcHK-His\ tag} = 35\ 410\ M^{-1}cm^{-1}$, $\varepsilon_{280-AfGcHK-MBP\ tag} = 101\ 760\ M^{-1}cm^{-1}$, $\varepsilon_{280-RR-His\ tag} = 2\ 980\ M^{-1}cm^{-1}$), l označuje optickou dráhu paprsku světla ($l = 0,05\text{ cm}$) a M představuje molekulovou hmotnost proteinu (g/mol), ($M_{AfGcHK-His\ tag} = 42\ 763\text{ g/mol}$, $M_{AfGcHK-MBP\ tag} = 84\ 968\text{ g/mol}$, $M_{RR-His\ tag} = 26\ 674\text{ g/mol}$). Hodnoty teoretických molekulových hmotností a molárních absorpčních koeficientů byly stanoveny pomocí aplikace Expasy - ProtParam⁷¹ s využitím aminokyselinových sekvencí daných proteinů získaných z databáze UniProt⁷².

5.3 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)

Pro provedení SDS-PAGE byla použita elektroforetická aparatura Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad. Do aparatury byla vložena čistá skla, která byla následně naplněna roztokem pro přípravu 10% separačního gelu obsahující 6,7 ml pufru B (0,1% w/v SDS, 375 mM 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 peroxidisírany amonného (koncentrace 100 mg/ml). Tato směs byla převrstvena deionizovanou vodou, která byla mezi skly ponechána do ukončení polymerizace

roztoku a vytvoření gelu (přibližně 35 minut). Po uplynutí doby byla voda odstraněna a na separační gel byl navrstven roztok pro přípravu 4% zaostřovacího gelu obsahujícího 3,5 ml pufru C (0,1 % w/v SDS, 125 mM Tris-HCl, pH 8,8), 533 μ l polymerizačního roztoku C (30 % w/v akrylamid; 0,8 % w/v BIS v pufru C), 4 μ l TEMED a 80 μ l peroxidisíranu amonného (koncentrace 100 mg/ml). Do roztoku pro přípravu zaostřovacího gelu byl vložen hřeben na vytvoření jamek určených pro aplikaci vzorků do gelu. Po ukončení polymerizace roztoku a vytvoření zaostřovacího gelu byla aparatura se skly vložena na elektroforetické vany, která byla naplněna elektrodovým pufrům obsahující 0,1% w/v SDS, 0,192 mol/l glycinu, 0,025 mol/l Tris-HCl (pH 8,3).

Odebrané vzorky během izolace příslušných proteinů (kapitola 5.1.4) a vzorky finálních preparátů byly připraveny pro SDS-PAGE naředěním deionizovanou vodou a smícháním se 4x koncentrovaným redukujícím vzorkovým pufrům (8 % w/v SDS, 250 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20 % v/v 2-merkaptoethanol; 40 % v/v glycerol, 0,008 % w/v bromfenolová modř). Výsledné složení připravených vzorků je uvedeno v tabulce 1.

Tabulka 1: Složení vzorků z izolace proteinů pro SDS-PAGE.

Vzorek	Objem vzorku [μ l]	Objem deionizované vody [μ l]	Objem vzorkového pufru [μ l]	Hmotnost proteinu v jamce [μ g]
Vzorek č. 1: Supernatant proteinů po ultracentrifugaci	2,5	5,0	2,5	-
Vzorek č. 2: Nezachycené proteiny na afinitním nosiči	7,5	0	2,5	-
Vzorek č. 3: Eluát proteinů zachycených na afinitním nosiči	2,5	5,0	2,5	-
Vzorek č. 4: Finální preparát proteinu (2 mg/ml)	0,5	3,25	1,25	1
	1	6,50	2,50	2
	2	13,00	5,00	4

Poté byly vzorky promíchány, inkubovány při teplotě 100 °C po dobu 5 minut (Mini Dry Bath, MD-MINI, Major Science) a krátce stočeny na centrifuze (Mini centrifuge C1301, Labnet). Z připravených polyakrylamidových gelů byl vyjmut hřeben a do vzniklých jamek byly nanесeny vzorky po 10 μ l a do jedné z jamek také 10 μ l standardu (Precision Plus Protein™ Unstained Standard). Poté byla zahájena SDS-PAGE připojením aparatury ke zdroji o napětí 200 V (PowerPac Basic Power Supply, Bio-Rad) a takto byla ponechána po dobu 70 minut. Po ukončení byl gel přenesen do roztoku InstantBlue Protein Stain, kde probíhalo barvení proteinů po dobu 1 hodiny. Poté byly gely z barvicí lázně vyjmuty, opláchnuty deionizovanou vodou a následně vloženy na 1 hodinu do deionizované vody pro úplné vymytí zbytkové

nezachycené barvy. Nakonec byl pořízen obrazový záznam gelů pro budoucí vyhodnocení (Perfection V550 Photo, Epson). Závěrem byla identickým způsobem provedena SDS-PAGE všech tří finálních preparátů proteinů, které byly smíchány s deionizovanou vodou a vzorkovým pufrům tak, aby výsledná hmotnost proteinu v jamce činila 2 µg. Ze záznamu této analýzy byla denzitometricky stanovena čistota finálních preparátů proteinů AfGcHK-His tag, RR-His tag a AfGcHK-MBP tag pomocí programu ImageJ.

5.4 Analýza mechanismu přenosu signálu v komplexu AfGcHK:RR pomocí Phos-tag elektroforézy

Pro studium interakce proteinu AfGcHK s jeho interakčním partnerem RR byla provedena Phos-tag elektroforéza. Do elektroforetické aparatury Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad byla vložena čistá skla a následně byla naplněna roztokem pro přípravu 10% separačního Phos-tag gelu obsahujícího 3,3 ml pufru B (0,1% w/v SDS, 375 mM Tris-HCl, pH 8,8), 1,7 ml polymeračního roztoku B (30% w/v akrylamid, 0,8% w/v BIS v pufru B), 10 µl chloridu manganatého (o koncentraci 100 mM), 38 µl roztoku Phos-tag (o koncentraci 5 mM), 5 µl roztoku TEMEDu a 50 µl peroxidisíranu amonného (o koncentraci 100 mg/ml). Roztok pro přípravu separačního gelu byl převrstven deionizovanou vodou a ponechán po dobu 30 minut při laboratorní teplotě do ukončení polymerizace a vytvoření gelu. Vrstva vody byla následně odstraněna a její přebytky byly z prostoru mezi skly odsáty filtračním papírem. Poté byl na separační gel navrstven roztok pro přípravu 4% zaostřovacího gelu obsahujícího 1,7 ml pufru C (0,1% w/v SDS, 125 mM Tris-HCl, pH 8,8), 267 µl polymeračního roztoku C (30% w/v akrylamid, 0,8% w/v BIS v pufru C), 2 µl TEMEDu a 40 µl persíranu amonného (o koncentraci 100 mg/ml). Do roztoku pro přípravu zaostřovacího gelu byl vložen hřeben za účelem vytvoření jamek sloužících pro nanášení vzorků, a poté byl roztok ponechán při laboratorní teplotě po dobu 45 minut do ukončení polymerizace a vytvoření gelu. Po uplynutí této doby byla skla obsahující připravené gely umístěna do elektroforetické aparatury.

Následujícím krokem byla příprava proteinového komplexu AfGcHK:RR smícháním roztoků proteinů AfGcHK a RR (oba o výsledné koncentraci 10 µM), 1 µl Tris-HCl (koncentrace 1 M, pH 8,0), 2 µl chloridu draselného (koncentrace 0,5 M) a 1 µl chloridu hořečnatého (koncentrace 100 mM) tak, aby objem výsledné směsi byl 19 µl. Takto připravená směs byla inkubována při 20 °C po dobu 5 minut a poté byl do směsi přidán roztok 1 µl ATP (koncentrace 100 mM) pro započítání fosfotransferové reakce. Výsledné koncentrace jednotlivých složek směsi byly následující: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM chloridu draselného, 5 mM chloridu hořečnatého, 1 mM ATP. Celkem bylo připraveno 10 mikrozkušavek, z nichž každá obsahovala 20 µl připravené směsi s probíhající fosfotransferázovou reakcí. V časech 0 min, 0,5 min, 1 min,

2 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 40 min a 60 min od počátku reakce byly postupně v jednotlivých mikrozkušavkách ukončeny reakce přidáním 10 μ l terminačního pufru obsahujícího 0,25M Tris-HCl (pH 8,0), 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) 2-merkaptoethanol, 40% (v/v) glycerol, 0,004% (w/v) bromfenolovou modř. Vzorek obsahující terminační pufr byl inkubován při 60 °C po dobu 5 minut a poté byl temperován na laboratorní teplotu.

Z předem připraveného polyakrylamidového gelu obsahujícího SDS a Phos-tag byl vyjmut hřeben a do utvořených jamek byly nanесeny vzorky proteinového komplexu AfGcHK:RR, u nichž probíhala fosfotransferázová reakce po určitou dobu. Elektroforetická aparatura byla připojena ke zdroji s nastaveným napětím 200 V (PowerPac Basic Power Supply, Bio-Rad) a takto byla ponechána po dobu 50 minut, dokud vzorky nedoputovaly ke spodní hranici gelu. Po ukončení elektroforézy byl gel vyjmut ze skel, opláchnut deionizovanou vodou a následně ponořen do barvicí lázně roztoku InstantBlue Protein Stain. Za stálého míchání byl gel inkubován v barvicí lázni po dobu 60 minut a poté byl opláchnut a ponořen do deionizované vody po dobu dalších 60 minut. Na závěr byl pořízen obrazový záznam gelu pomocí skeneru Perfection V550 Photo, Epson.

Pro srovnání byla provedena druhá obdobná analýza s totožným pracovním postupem jako v případě Phos-tag elektroforézy, ve které byl v roztoku pro přípravu gelu chlorid manganatý nahrazen chloridem hořečnatým (ve stejném množství a koncentraci).

5.5 Modelování struktury komplexu AfGcHK:RR pomocí programu AlphaFold3

Jelikož doposud nebyla odhalena struktura celé histidinkinázy AfGcHK ani komplexu AfGcHK:RR, bylo provedeno teoretické modelování struktury za pomoci nejnovější verze programu AlphaFold3, který je schopen predikovat strukturu nejen samostatných proteinů, ale i proteinových komplexů⁷³. Jako vstupní hodnoty byly zadány aminokyselinové sekvence proteinů AfGcHK a RR, přičemž histidinkináza AfGcHK v podobě dvou kopií a RR v jedné kopii, aby byl zachován zjištěný stechiometrický poměr 2:1⁶⁵. Dále byla vložena molekula hemu (opět ve dvou kopiích) jako ligand sensorové domény histidinkinázy. Výsledek byl graficky zpracován pomocí programu ChimeraX ver. 1.9.

5.6 Kryoelektronová mikroskopie komplexu AfGcHK:RR a proteinu AfGcHK-MBP tag

5.6.1 Příprava vzorků pro kryoelektronovou mikroskopii

Před samotnou elektronovou mikroskopií bylo potřeba připravit komplex proteinů AfGcHK a RR. K přípravě komplexu byly použity proteiny ihned po závěrečném kroku jejich izolace nebo byly použity již zamražené roztoky proteinů, které byly ponechány roztát na ledu při laboratorní teplotě. Komplex AfGcHK:RR byl připraven smícháním proteinů AfGcHK-His tag a RR-His tag v molárním poměru 2:1 a následně byla provedena gelová permeační chromatografie (chromatografický systém ÄKTAprime plus, kolona Superdex 200 increase 10/300 GL, GE Healthcare). V případě samotného proteinu AfGcHK-MBP tag byla provedena také gelová permeační chromatografie dle následujícího postupu.

Roztoky mobilní fáze a deionizované vody byly sterilizovány v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut (MLS-3781L, PHCbi) a přefiltrovány (Millipore Express PLUS 0,22 µm, Merck). Poté byl promyt deionizovanou vodou a mobilní fází (20 mM Tris-HCl (pH 8,0) a 150 mM NaCl) systém hadiček, nástřikové smyčky a sběrače frakcí. Následně byla nasazena kolona a promyta přibližně 50 ml mobilní fáze s průtokem 0,2 ml/min a tlakem 1 MPa. Roztok proteinu byl přefiltrován přes filtr s membránou o velikosti pórů 0,22 µm (Millipore Express PLUS 0,22 µm, Merck). Do nástřikové smyčky bylo injekční stříkačkou s jehlou vpraveno 500 µl roztoku proteinu, přičemž průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min a tlak se pohyboval kolem hodnoty 1 MPa. Pomocí detektoru byly zaznamenávány hodnoty absorbance při vlnové délce 280 nm a v okamžiku nejvyšších naměřených hodnot byly sbírány jednotlivé frakce proteinů. Poté byly finální roztoky komplexu AfGcHK:RR či proteinu AfGcHK-MBP tag naředěny na koncentrace 1 mg/ml, 0,1 mg/ml a 0,01 mg/ml.

5.6.2 Negativní barvení

Negativní barvení a snímání na elektronovém mikroskopu bylo provedeno Mgr. et MgA. Adamem Schröfelem, Ph.D. dle následujícího postupu. Pro danou metodu byly zvoleny kontinuální karbonové Cu mřížky Quantifoil pro kryoelektronovou mikroskopii (300 ok o velikosti 2 µm), jímž byla předem zvýšena hydrofilita za pomocí systému PELCO easiGlow - Glow Discharge Cleaning System. Následující negativní barvení bylo provedeno dle uvedeného protokolu⁷⁴. Na Cu mřížku byly nanášeny 2 µl roztoku proteinové komplexu AfGcHK:RR/proteinu AfGcHK-MBP o koncentraci 0,01 mg/ml a po uplynutí 30 s byl přebytečný roztok odsán filtračním papírem. Poté byla mřížka opláchnuta ultračistou vodou tak, že byla postupně smočena ve dvou jednotlivých kapkách ultračisté vody a přebytek byl opět odsán

filtračním papírem. Pro barvení byl použit 1% *w/v* roztok uranylacetátu, ze kterého byly na pracovní plochu nanесeny 2 kapky. Do první kapky byla ponořena Cu mřížka obsahující protein a přebytečné barvivo bylo ihned odsáto. Následně byla mřížka vložena do druhé kapky, byla zde ponechána po dobu 30 s a poté byl přebytečný roztok také odsán filtračním papírem. Takto připravené mřížky byly ponechány uschnout v digestoři.

Data byla nasnímana pomocí elektronového mikroskopu JEM-2100Plus, JEOL s krystalovou katodou LaB₆, při napětí 200 kV, dávce 50 e⁻/Å², kamerou TemCam-XF416 4K CMOS, TVIPS. Pro komplex proteinů AfGcHK:RR bylo nasnímano celkem 54 videí, s velikostí pixelu 1,93 Å/px. Nasbíraná data byla zpracována pomocí programu CryoSPARC. Nejprve byly na nasnímaná videa aplikovány funkce korekce pohybu (lokální a celková) a funkce přenosu kontrastu (CTF, z angl. contrast transfer function) a následně byla použita funkce „Blob picker“ pro výběr částic v rozmezí velikostí 50-200 Å. Ze získaných a upravených mikrografů bylo při nastavení velikosti okna 256 px vybráno celkem 174 358 částic. Z těchto částic byla provedena první 2D klasifikace a vybrané 2D třídy proteinů byly použity jako šablona pro opětovný výběr částic. Při zvolené velikosti okna 100 px bylo vybráno 142 189 částic, které byly v rámci druhé 2D klasifikace roztrženy do 20 tříd. Následná 3D rekonstrukce struktury proteinu nebyla provedena, jelikož získané 2D třídy nebyly dostatečné kvality. V případě proteinu AfGcHK-MBP nejsou uvedeny podrobnosti o snímání, jelikož došlo k precipitaci proteinu při přípravě vzorku.

5.6.3 Kryoelektronová mikroskopie

Příprava, snímání na elektronovém mikroskopu a následná analýza byly provedeny Mgr. Danielem Rozbeským, Ph.D a Mgr. et MgA. Adamem Schröfelem, Ph.D dle následujícího postupu. Roztok proteinového komplexu AfGcHK:RR byl smíchán s 3mM detergentem CHAPSO do výsledné koncentrace proteinu 1 mg/ml. Následující příprava mřížek probíhala v mrazicí komoře Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific) při teplotě 4°C a vlhkosti v rozmezí 90 - 100 %. Na mřížku UltraAuFoil (300 ok, R 1,2/1,3) byly nanесeny 4 µl roztoku proteinu. Poté proběhla 10s inkubace následovaná přenosem na filtrační papír (tzv. blottingem) trvající 4 s. Na závěr byla mřížka rychle zmrazena ponořením do kapalného ethanu a do dalšího použití byla uchována v boxu v kapalném dusíku při teplotě -80 °C.

Snímání dat probíhalo na elektronovém mikroskopu JEM-2100Plus, JEOL s krystalovou katodou LaB₆, při napětí 200 kV, kamerou TemCam-XF416 4K CMOS, TVIPS. Pro komplex proteinů AfGcHK:RR bylo celkem nasnímano celkem 271 videí s velikostí pixelu 1,41 Å/px a hodnotou rozostření v intervalu -1,4 až -2,8 µm. Nasbíraná data byla zpracována pomocí

programu CryoSPARC. Všechny 271 videí bylo podrobena korekci pohybu (lokální i celkové) a CTF a ze vzniklých mikrosnímků bylo pomocí funkce „blob picker“ s nastavenou velikostí částic 50–150 Å a velikostí okna 150 px vybráno celkem 529 036 částic. Následně byla provedena 2D klasifikace, která všechny vybrané částice rozřadila do 30 tříd. Poté proběhla ab-initio 3D rekonstrukce, kterou byly vytvořeny dva 3D modely, u kterých bylo provedeno heterogenní a homogenní zpřesnění struktury. Heterogenní zpřesnění se provádí v případě, že by vzorek mohl obsahovat více různých tříd, například více různých struktur či konformačních stavů. Homogenní zpřesnění se provádí u vzorku, kde všechny částice zastupují tutéž strukturu.

6 VÝSLEDKY

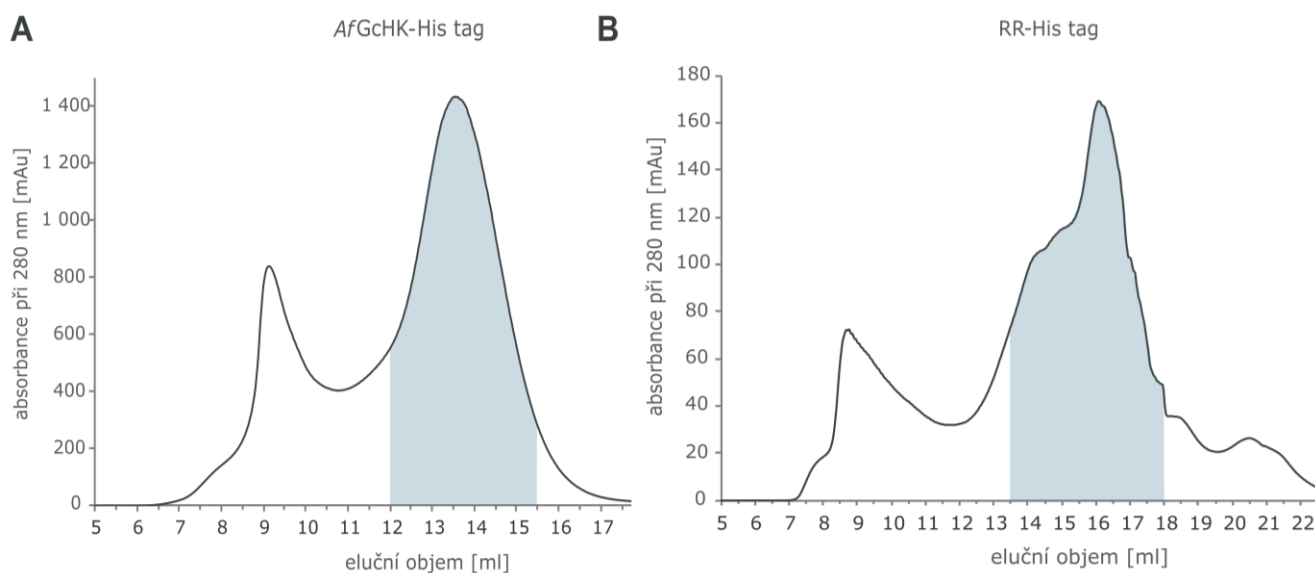
6.1 Příprava rekombinantních proteinů AfGcHK-His tag, AfGcHK-MBP tag a RR-His tag

6.1.1 Exprese rekombinantních proteinů AfGcHK-His tag, AfGcHK-MBP tag a RR-His tag

Kmen buněk *E.coli* BL-21 (DE3) byl transformován plasmidy pET-21c(+)/AfGcHK-His tag, pMal-c5e/AfGcHK-MBP tag a pET-21c(+)/RR-His tag a následně kultivován na LB agaru (kapitola 5.1.2, str. 33). Na všech agarových plotnách obsahující transformované buňky byly patrné narostlé kolonie bakterií *E.coli*, zatímco negativní kontroly byly zcela bez přítomnosti jediné kolonie bakterií. Poté byla v buňkách indukována exprese příslušných proteinů (kapitola 5.1.3, str. 34). Výsledný výtěžek buněk obsahující protein AfGcHK-His tag činil 19,2 g (tj. 9,6 g buněk na 1 l TB média), výtěžek buněk s RR-His tag činil 24,4 g (tj. 6,1 g buněk na 1 l TB média) a výtěžek buněk s AfGcHK-MBP tag činil 16,3 g (tj. 8,15 g na 1 l TB média).

6.1.2 Izolace rekombinantních proteinů AfGcHK-His tag, AfGcHK-MBP tag a RR-His tag

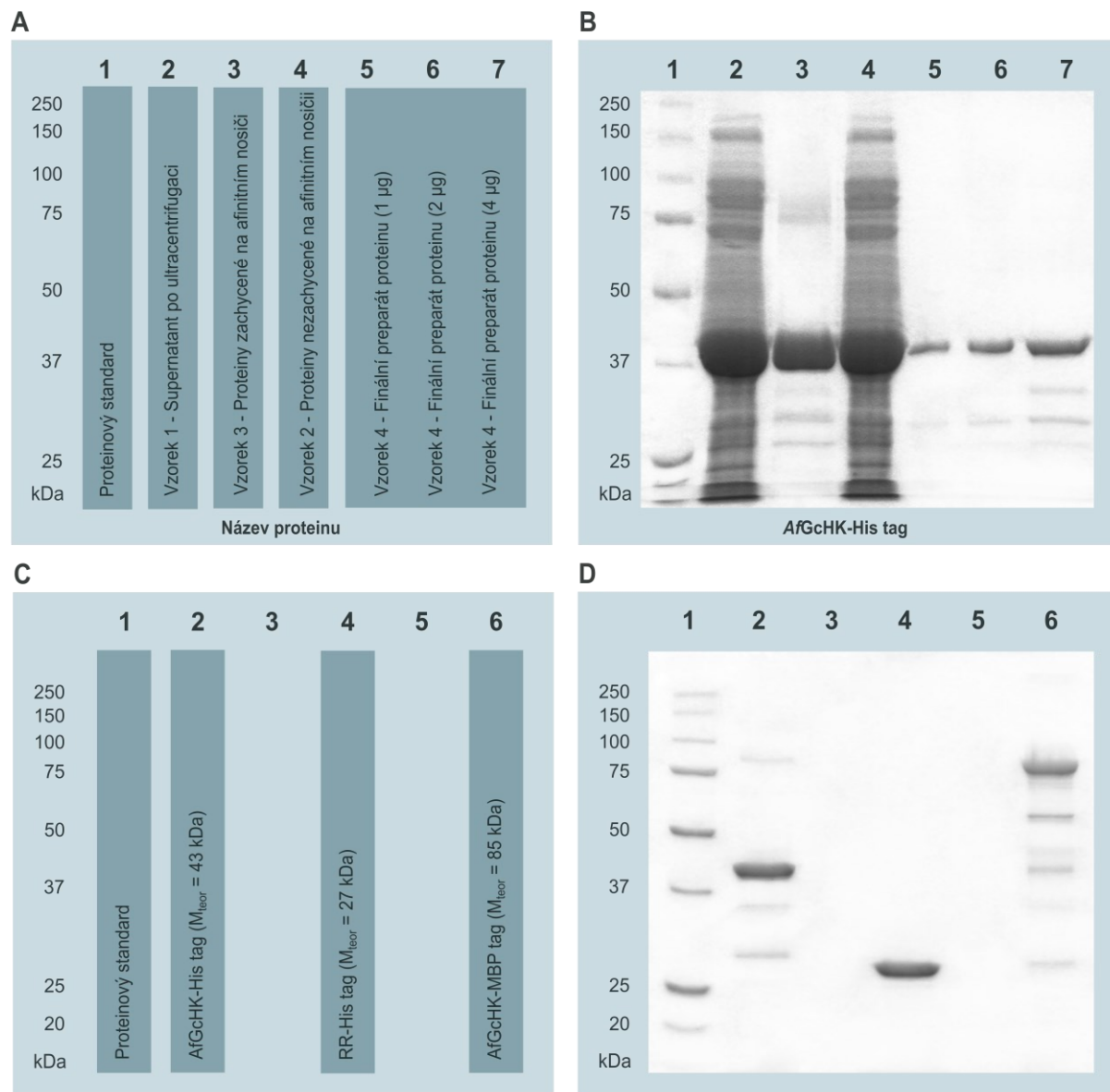
Po expresi daných proteinů v buňkách *E. coli* byla provedena izolace AfGcHK-His tag, AfGcHK-MBP tag a RR-His tag z buněk, jejímž závěrečným separačním krokem byla gelová permeační chromatografie (kapitola 5.1.4, str. 35). V případě AfGcHK-His tag byly na chromatogramu (Obrázek 10, část A, str. 45) zaznamenány dva píky. První pík, který svého maxima dosahuje při elučním objemu 9,1 ml, představuje balastní proteiny o vyšších molekulových hmotnostech, případně také protein AfGcHK-His tag ve vysokém oligomerním stavu. Druhý pík s maximem při elučním objemu 13,5 ml představuje homodimer AfGcHK-His tag. Jímány byly frakce v rozsahu elučních objemů 12-15,5 ml (vyznačen modrou barvou na obrázku 10, část A, str. 45). Na zaznamenaném chromatogramu proteinu RR-His tag (Obrázek 10, část B, str. 45) jsou patrné dva píky, z nichž pík s maximem v elučním objemu 8,7 ml představuje balastní proteiny o vyšších molekulových hmotnostech, případně také protein RR-His tag ve vysokém oligomerním stavu a druhý pík s maximem v 16,1 ml představuje monomer RR-His tag. Jímány byly frakce v rozsahu elučních objemů 13,5-18 ml (vyznačen modrou barvou na obrázku 10, část B, str. 45). V případě proteinu AfGcHK-MBP tag není chromatografický záznam dostupný.



Obrázek 10: Chromatografický záznam gelové permeační chromatografie proteinu AfGcHK-His tag (A) a RR-His tag (B). A) Protein AfGcHK-His tag - graf závislosti absorbance při 280 nm na elučním objemu. Křivka zobrazuje dva píky, přičemž první s maximem v 9,1 ml představuje balastní proteiny o vyšších molekulových hmotnostech a případně protein AfGcHK-His tag ve vysokém oligomerním stavu. Druhý pík s maximem v 13,5 ml představuje homodimer AfGcHK-His tag. Modrou barvou je vyznačena oblast frakcí proteinu, které byly spojeny a poskytly finální preparát proteinu AfGcHK-His tag. B) Protein RR-His tag - graf závislosti absorbance při 280 nm na elučním objemu. Křivka zobrazuje dva píky, přičemž první s maximem v 8,7 ml představuje balastní proteiny o vyšších molekulových hmotnostech a případně protein RR-His tag ve vysokém oligomerním stavu proteinu a druhý pík s maximem v 16,1 ml představuje monomer RR-His tag. Modrou barvou je vyznačena oblast spojených frakcí protein, které představují finální preparát RR-His tag.

K vyhodnocení úspěšnosti purifikace příslušných proteinů byla provedena SDS-PAGE vzorků odebraných během izolace proteinů (kapitola 5.3, str. 37). Jednalo se o vzorky supernatantu po ultracentrifugaci lyzátu buněk *E. coli* BL-21 (DE3) obsahující daný protein, dále vzorky z afinitní chromatografie zahrnující proteiny nezachycené na afinitním nosiči, eluát proteinů zachycených na afinitním nosiči a finální preparát purifikovaného proteinu. Záznam SDS-PAGE z průběhu izolace proteinů je zobrazen na obrázku 11 na str. 46, část A zobrazuje schéma rozmístění vzorků a část B zobrazuje záznam SDS-PAGE. První dráha obsahuje proteinový standard, v dráze 2 se nachází supernatant po ultracentrifugaci (vzorek č. 1), v dráze 3 eluát proteinů zachycených na afinitním nosiči (vzorek č. 3), v dráze 4 jsou proteiny nezachycené na afinitním nosiči (vzorek č. 2) a dráhy 5–7 obsahují finální preparát proteinu o třech různých koncentracích (vzorek č. 4). Čísla vzorků odpovídají číslování v metodách v tabulce 1, str. 38. Jako příklad je uvedena detailní analýza vzorků odebraných během izolace proteinu AfGcHK-His tag pomocí metody SDS-PAGE (Obrázek 11, část B, str. 46). Ve všech drahách obsahujících vzorky se nachází protein o přibližné velikosti 40 kDa odpovídající AfGcHK-His tag s teoretickou molekulovou hmotností 43 kDa. Zatímco v dráze 2 a 4 je přítomna celá škála

proteinů s různou molekulovou hmotností, tak v drahách 3 a 5-7 (představující vzorky již po proběhlé afinitní chromatografii v případě dráhy 3 a gelové permeační chromatografii v případě drah 5-7) se nachází především protein AfGCHK-His tag a balastních proteinů výrazně ubylo. Data z analýzy vzorků průběhu izolace proteinů RR-His tag a AfGCHK-MBP nejsou uvedena.



Obrázek 11: Analýza vzorků odebraných během jednotlivých izolačních kroků proteinu AfGCHK-His tag pomocí SDS-PAGE a analýza finálních preparátů proteinů AfGCHK-His tag, RR-His tag a AfGCHK-MBP tag pomocí SDS-PAGE. A) Schéma rozmístění vzorků z izolace proteinů pro analýzu pomocí SDS-PAGE. B) Záznam z analýzy SDS-PAGE proteinu AfGCHK-His tag. Ve všech drahách je patrná přítomnost proteinu o přibližné molekulové hmotnosti 40 kDa představující AfGCHK-His tag s teoretickou molekulovou hmotností 43 kDa. C) Schéma rozmístění vzorků v gelu pro analýzu finálních preparátů proteinů pomocí SDS-PAGE. D) V dráze číslo 2 je patrná přítomnost proteinu odpovídající přibližné molekulové hmotnosti 40 kDa odpovídající proteinu AfGCHK-His tag s teoretickou molekulovou hmotností 43 kDa. V dráze číslo 4 se nachází protein, jehož molekulová hmotnost představuje přibližně 25 kDa, a tím odpovídá proteinu RR-His tag (teoretická molekulová hmotnost = 27 kDa). V dráze 6 je přítomný protein s molekulovou hmotností přibližně 80 kDa, čímž odpovídá proteinu AfGCHK-MBP tag s teoretickou molekulovou hmotností 85 kDa.

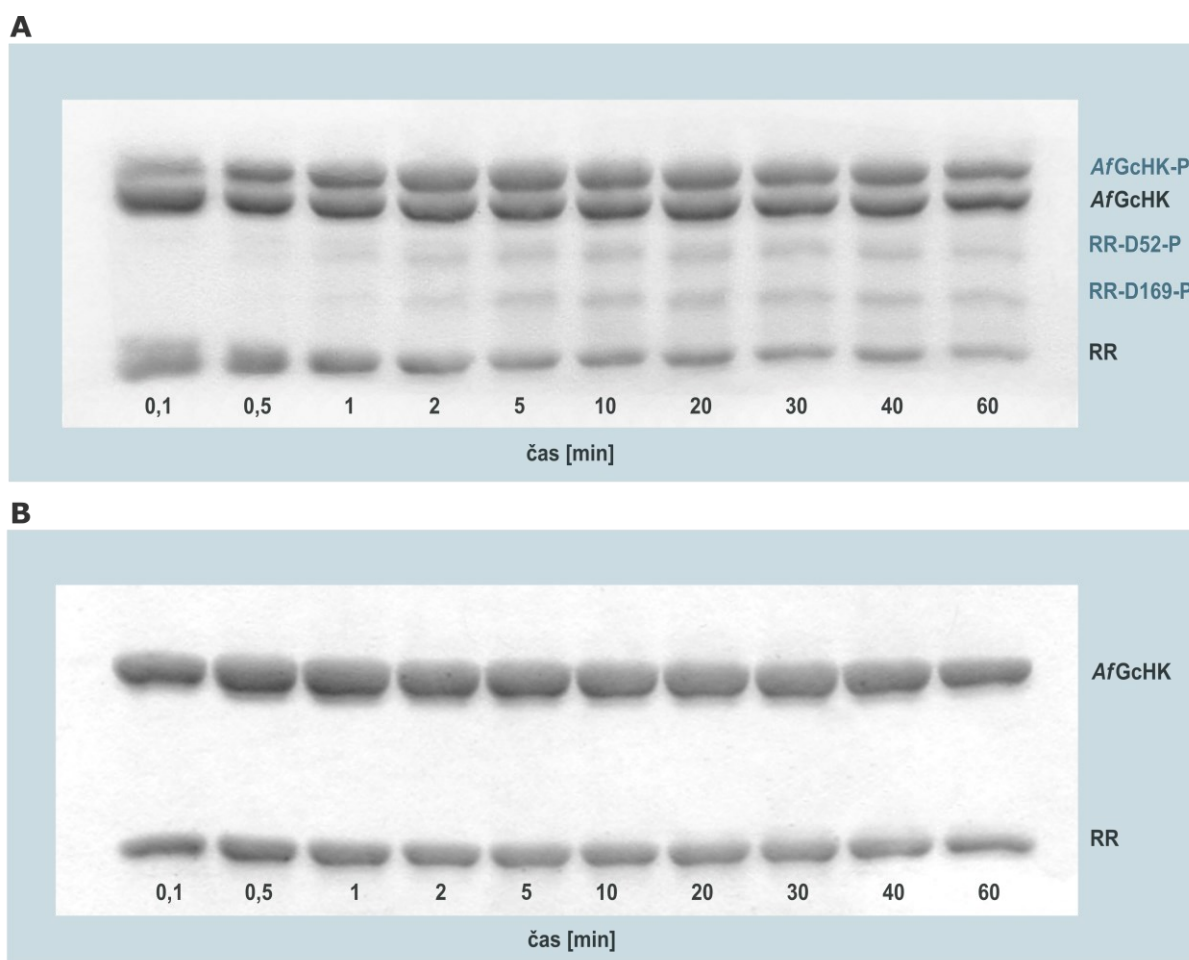
Záznam analýzy všech tří finálních izolovaných proteinů AfGcHK-His tag, AfGcHK-MBP tag a RR-His tag pomocí SDS-PAGE je zobrazen na obrázku 11, část D, str. 46. Schéma rozložení vzorků je zobrazeno na obrázku 11, část C, str. 46. V dráze 1 se nachází proteinový standard, v dráze 2 je patrná přítomnost proteinu o přibližné molekulové hmotnosti 40 kDa odpovídající proteinu AfGcHK-His tag s teoretickou molekulovou hmotností 43 kDa. V dráze 4 lze pozorovat protein s přibližnou molekulovou hmotností 25 kDa, čímž odpovídá proteinu RR-His tag s teoretickou molekulovou hmotností 27 kDa. Dráha 6 obsahuje protein odpovídající molekulové hmotnosti 80 kDa, která koresponduje s teoretickou molekulovou hmotností 85 kDa proteinu AfGcHK-MBP tag. Čistota finálních preparátů proteinů činila 80 % pro protein AfGcHK-His-tag, 99 % pro protein RR-His tag a 65 % pro protein AfGcHK-MBP tag.

Koncentrace izolovaných proteinů byla stanovena spektrofotometricky na základě Lambert-Beerova zákona (kapitola 5.2, str. 37). Bylo získáno celkem 260 μ l proteinu AfGcHK-His tag o hmotnostní koncentraci 71,4 mg/ml odpovídající látkové koncentraci 1,660 mM. Dále bylo získáno 660 μ l proteinu RR-His tag o hmotnostní koncentraci 7,5 mg/ml odpovídající látkové koncentraci 290 μ M. Výtěžek z buněk kultivovaných v 1 l TB média činil v případě AfGcHK-His tag 9,3 mg a v případě RR-His tag 1,2 mg. Z připraveného proteinu AfGcHK-MBP tag byla použita pro experimenty pouze frakce o nejvyšší hmotnostní koncentraci 9,98 mg/ml odpovídající látkové koncentraci 117 μ M.

6.2 Mechanismus autofosforylační a fosfotransferázové reakce v rámci proteinového komplexu AfGcHK:RR

Pro studium vzájemné interakce jednotlivých komponent proteinového komplexu AfGcHK:RR byla použita metoda Phos-tag elektroforézy (kapitola 5.4, str. 39). Na polyakrylamidový gel byly nanесeny vzorky obsahující roztok proteinů AfGcHK-His tag a RR-His tag, ke kterým bylo při přípravě přidáno ATP a byly zajištěny optimální podmínky pro proběhnutí autofosforylační a fosfotransferázové reakce. Jednotlivé vzorky se od sebe lišily v časech ukončení probíhajících reakcí. Analýza autofosforylační a fosfotransferázové reakce je zobrazena na obrázku 12, část A, str. 48. Protein AfGcHK-His tag se nachází v horní části gelu, přičemž jeho signál je rozdělen tak, že frakce nefosforylované formy AfGcHK-His tag má vyšší mobilitu v gelu (nachází se níže) a AfGcHK-His tag po proběhlé autofosforylaci má mobilitu v gelu nižší (nachází se nahoře). Je patrné, že krátce po započetí reakce (v čase 10 sekund od počátku reakce) je ve větší míře přítomna nefosforylovaná forma AfGcHK-His tag oproti fosforylované formě proteinu. Jak s postupujícím časem probíhá autofosforylační reakce, přibývá fosforylované formy AfGcHK-His tag (od 30. sekundy od počátku reakce). Ve spodní části

gelu se nachází signál proteinu RR-His tag. V čase 30 sekund od počátku reakce je patrné, že začíná probíhat přenos fosfátu z AfGcHK-His tag na RR-His tag a s postupujícím časem klesá množství přítomného nefosforylovaného RR-His tag na úkor přibývajících forem fosforylovaného RR-His tag (viz dva pruhy nacházející se uprostřed gelu - D52-P nahoře a D169-P dole²). Zároveň je patrné, že v kratších inkubačních časech je intenzita D52-P formy vyšší než D169-P.



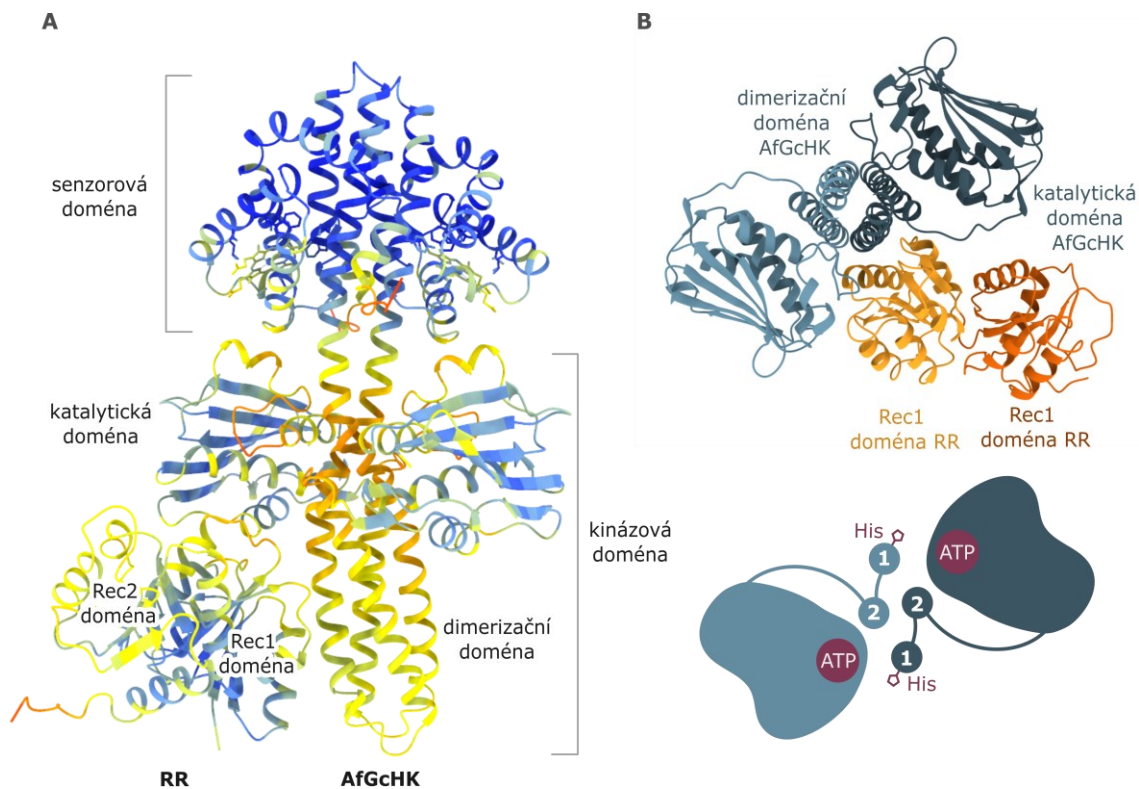
Obrázek 12: Záznam analýzy enzymové aktivity komplexu AfGcHK:RR metodou Phos-tag elektroforézy. A) Na obrázku lze pozorovat autofosforylaci proteinu AfGcHK a následnou fosfotransferázovou reakci z AfGcHK na RR. S přibývajícím časem dochází k nárůstu množství fosforylované formy AfGcHK (AfGcHK-P) v důsledku autofosforylační reakce. Naopak ubývá množství nefosforylované formy RR s tím, jak dochází k přenosu fosfátu a postupně vznikají fosforylované formy RR (RR-P). B) Analýza vzorků komplexu AfGcHK:RR při které byly zaměněny manganaté ionty za hořečnaté. Je patrné, že nedošlo k oddělení fosforylovaných forem proteinů od nefosforylovaných.

Pro srovnání byla provedena druhá analýza stejně připravených vzorků obsahujících roztok proteinů AfGcHK-His tag a RR-His tag, ke kterým bylo při přípravě přidáno ATP a byly zajištěny optimální podmínky pro proběhnutí autofosforylační a fosfotransferázové reakce. Rozdílem bylo přidání hořečnatých iontů do směsi namísto manganatých iontů. Výsledná analýza je zobrazena na obrázku 12 v části B, str. 48, kde jsou patrné pouze dvě sady pruhů, tudíž

nedošlo k separaci fosforylovaných forem proteinů od nefosforylovaných. Spodní pruhy představují nefosforylovanou formu RR spolu se všemi fosforylovanými formami RR a horní zahrnují fosforylovanou i nefosforylovanou formu AfGcHK. Touto analýzou bylo ověřeno, že ve všech inkubačních směsích se nachází v souhrnu stejné množství proteinů a lze proto porovnávat zastoupení jednotlivých forem proteinů na obrázku 12, část A, str. 48.

6.3 Modelování struktury komplexu AfGcHK:RR pomocí programu AlphaFold3

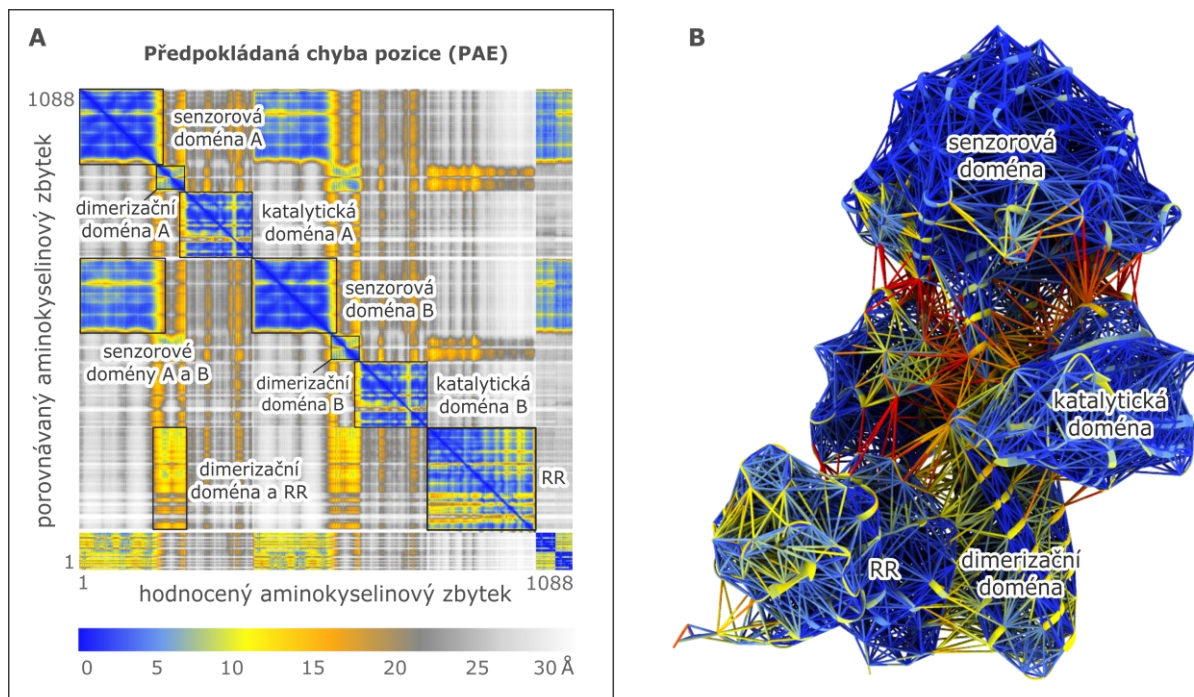
V programu AlphaFold3 bylo provedeno modelování struktury komplexu AfGcHK:RR (se stechiometrickým poměrem 2:1) obsahujícího dvě molekuly hemu jako ligandy sensorových domén histidinkinázy (kapitola 5,5, str. 40). Ve vytvořeném modelu je histidinkináza AfGcHK složena ze sensorové domény obsahující globinový motiv a funkční kinázové domény tvořené katalytickou a dimerizační doménou. Sensorová doména je propojena s funkční kinázovou doménou dvěma prodlouženými α helixy. Příslušný RR je tvořen dvěma Rec doménami, přičemž svou Rec1 doménou interaguje s dimerizační doménou AfGcHK (Obrázek 13, část A). Při pohledu na kinázovou doménu AfGcHK z pozice sensorové domény je patrné, že α helixy v dimerizační doméně mají pravotočivé uspořádání (Obrázek 13, část B). Hodnota



Obrázek 13: Model komplexu histidinkinázy AfGcHK a příslušného RR vytvořený v programu AlphaFold3. A) Na struktuře je barevně zobrazeno skóre pI-DDT, přičemž tmavě modrá barva představuje pI-DDT >90, světle modrá barva pI-DDT 90-70, žlutá barva pI-DDT 70-50 a oranžová barva pI-DDT <50. B) Pohled na kinázovou doménu AfGcHK a protein RR ze směru sensorové domény AfGcHK. V dimerizační doméně AfGcHK je patrné pravotočivé uspořádání α -helixů. Vytvořeno v programu ChimeraX ver. 1.9.

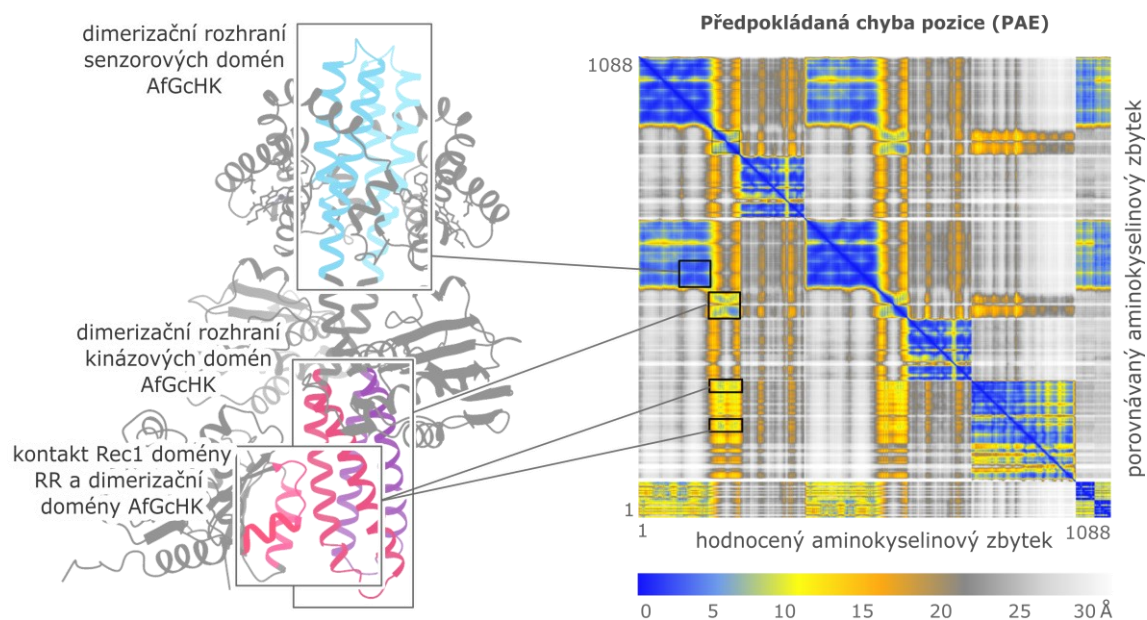
celkové přesnosti modelu (pTM, z angl. predicted template modeling) činila 0,55 a hodnota přesnosti interakce mezi jednotlivými podjednotkami (ipTM, z angl. interface predicted template modeling) činila 0,5. Výsledný model komplexu (Obrázek 13, část A, str. 49). je zbarven podle toho, jakých hodnot spolehlivosti dosahují jednotlivé aminokyselinové zbytky (pLDDT, z angl. predicted local distance difference test), (Obrázek 13, str. 49). Tmavě modrá barva představuje velmi vysokou přesnost (pLDDT > 90), světle modrá barva vysokou přesnost (pLDDT 90-70), žlutá barva nižší přesnost (pLDDT 70-50) a oranžová barva velmi nízkou přesnost (pLDDT < 50). Je patrné, že nejpřesněji je struktura modelu je odhadnuta pro sensorovou doménu AfGcHK, dále je velmi přesně odhadnuta struktura katalytické domény v kinázové doméně AfGcHK a také vnitřní struktury Rec domén RR. Nejméně přesný je N-koncový úsek sensorové domény AfGcHK a C-koncový úsek RR, dále oblast ATP víka v katalytické doméně AfGcHK a také spojení mezi sensorovou a kinázovou doménou AfGcHK. Vysokou míru nejistoty má i odhadnutá strukturní oblast, ve které dochází ke kontaktu proteinů AfGcHK:RR.

Věrohodnost vytvořeného modelu se stanovuje také na základě hodnot předpokládané chyby pozice (PAE, z angl. predicted aligned error), které představují předpokládanou chybovost pozice (Å) daného aminokyselinového zbytku vzhledem k pozici jiného aminokyselinového zbytku proteinu (Obrázek 14, část A, str. 50). Barevná škála je opět od modré barvy představující



Obrázek 14: Grafické znázornění věrohodnosti modelu komplexu AfGcHK:RR na základě hodnot předpokládané chyby pozice aminokyselinových zbytků (PAE). A) 2D graf hodnot PAE jednotlivých kombinací aminokyselinových zbytků. Modrá barva představuje nejnižší chybovost, naopak odstíny šedé až po bílou barvou vysokou chybovost. Na grafu jsou zvýrazněny jednotlivé oblasti proteinových domén B) Interpretace hodnot PAE vyznačením kontaktů mezi jednotlivými aminokyselinovými zbytky do vzdálenosti 8 Å s použitím barevné škály z části A. Vytvořeno v programu ChimeraX 1.9.

nejnižší chybovost, přes žlutou a oranžovou barvu až po bílou barvu s nejvyšší chybovostí. Na obrázku 14, v části B, je zobrazen model komplexu AfGcHK:RR, ve kterém jsou graficky znázorněny hodnoty PAE v podobě kontaktů mezi jednotlivými aminokyselinovými zbytky (zobrazeny jsou kontakty do vzájemné vzdálenosti 8 Å). V tomto zobrazení je patrná nízká chybovost vzájemné pozice aminokyselinových zbytků uvnitř sensorové a katalytické domény AfGcHK a také v Rec doménách RR. Pokud se zaměříme na oblasti, ve kterých dochází k proteinovým interakcím (Obrázek 15), lze si povšimnout vysoké přesnosti v dimerizačním rozhraní sensorových domén AfGcHK. Nižší přesnosti dosahuje oblast dimerizačního rozhraní kinázových domén AfGcHK, přesto se zde vyskytují oblasti s nižšími hodnotami PAE. Co se týká místa interakce AfGcHK s RR, zde se PAE pohybuje již ve vyšších hodnotách a přesnost této oblasti modelu je velmi nízká. Nicméně pokud se zaměříme na oblast C-konce $\alpha 8$ a N-konce $\alpha 9$ helixu dimerizační domény AfGcHK a oblast $\alpha 1$ helixu, $\alpha 5$ helixu, $\beta 5$ listu a $\alpha 5$ - $\beta 5$ smyčky RR, lze na grafu PAE (Obrázek 15) pozorovat místa s modrou barvou, tedy místa s nižší předpokládanou chybovostí pozice.

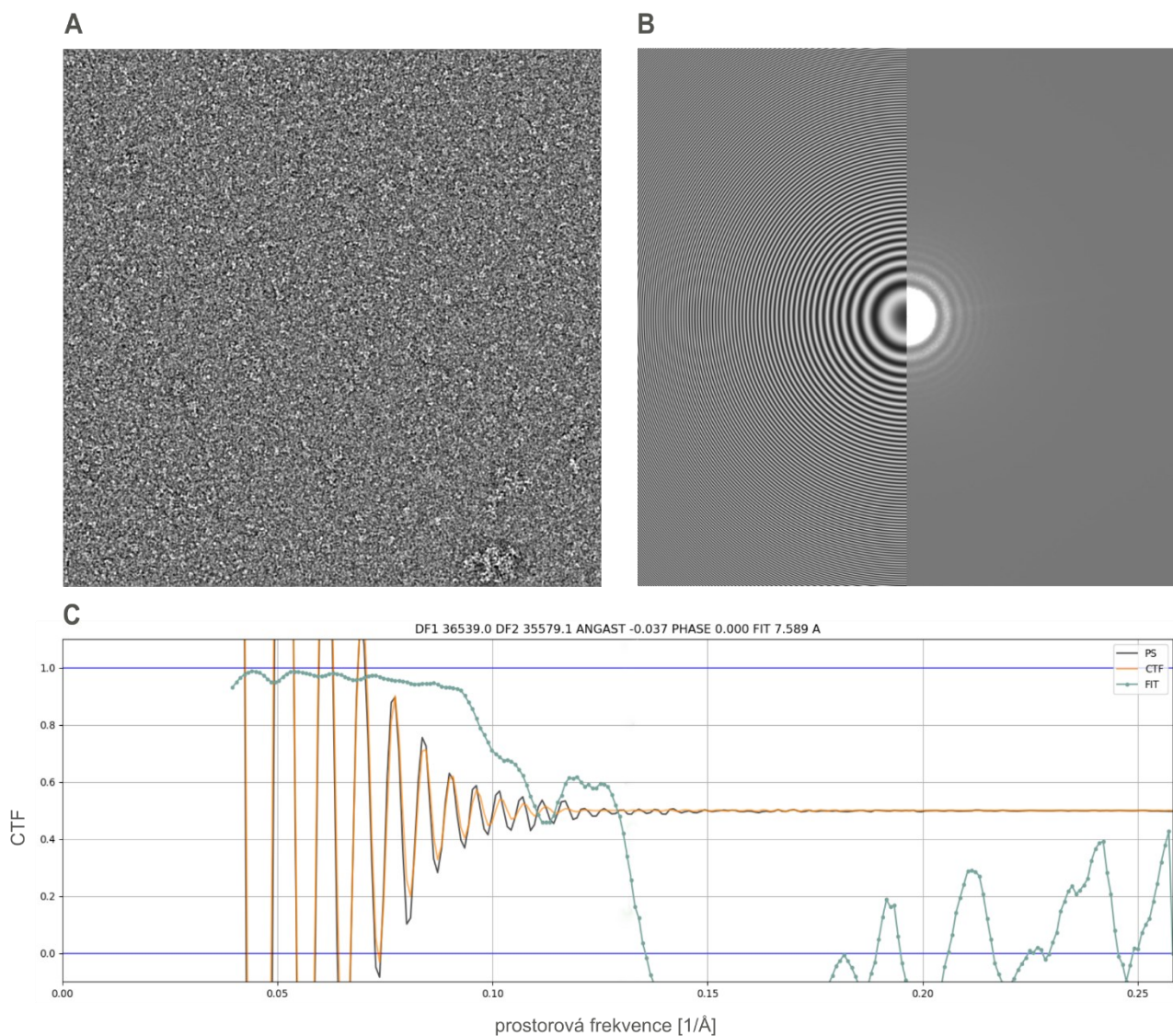


Obrázek 15: Grafické znázornění oblastí proteinových interakcí v modelu komplexu AfGcHK:RR a jejich odpovídajících hodnot předpokládané chyby pozice. Oblast dimerizačního rozhraní sensorových domén AfGcHK (světle modrá) dosahuje ve vytvořeném modelu vysoké přesnosti. Nižší přesnosti dosahuje oblast dimerizačního rozhraní kinázových domén AfGcHK (fialová/růžová) i oblast interakce AfGcHK s RR. Vytvořeno v programu ChimeraX ver 1.9.

6.4 Kryoelektronová mikroskopie komplexu AfGcHK:RR

6.4.1 Negativní barvení

Pro získání hrubé struktury komplexu proteinů AfGcHK:RR s nižším rozlišením byla použita metoda negativního barvení následovaná elektronovou mikroskopií (kapitola 5.6.2, str. 41). Vzorky byly obarveny roztokem uranylacetátu, který při snímání elektronovým mikroskopem vytváří tmavé pozadí, oproti kterému se částice proteinů či proteinových komplexů jeví světlejší. Celkem bylo nasnímáno 54 videí, s velikostí pixelu 1,93 Å/px. Na obrázku 16 je v části A uveden příklad jednoho ze zaznamenaných snímků, na kterém je patrné velké množství světlých částic na tmavém pozadí, jež by mohly představovat jednotlivé částice komplexu AfGcHK:RR,

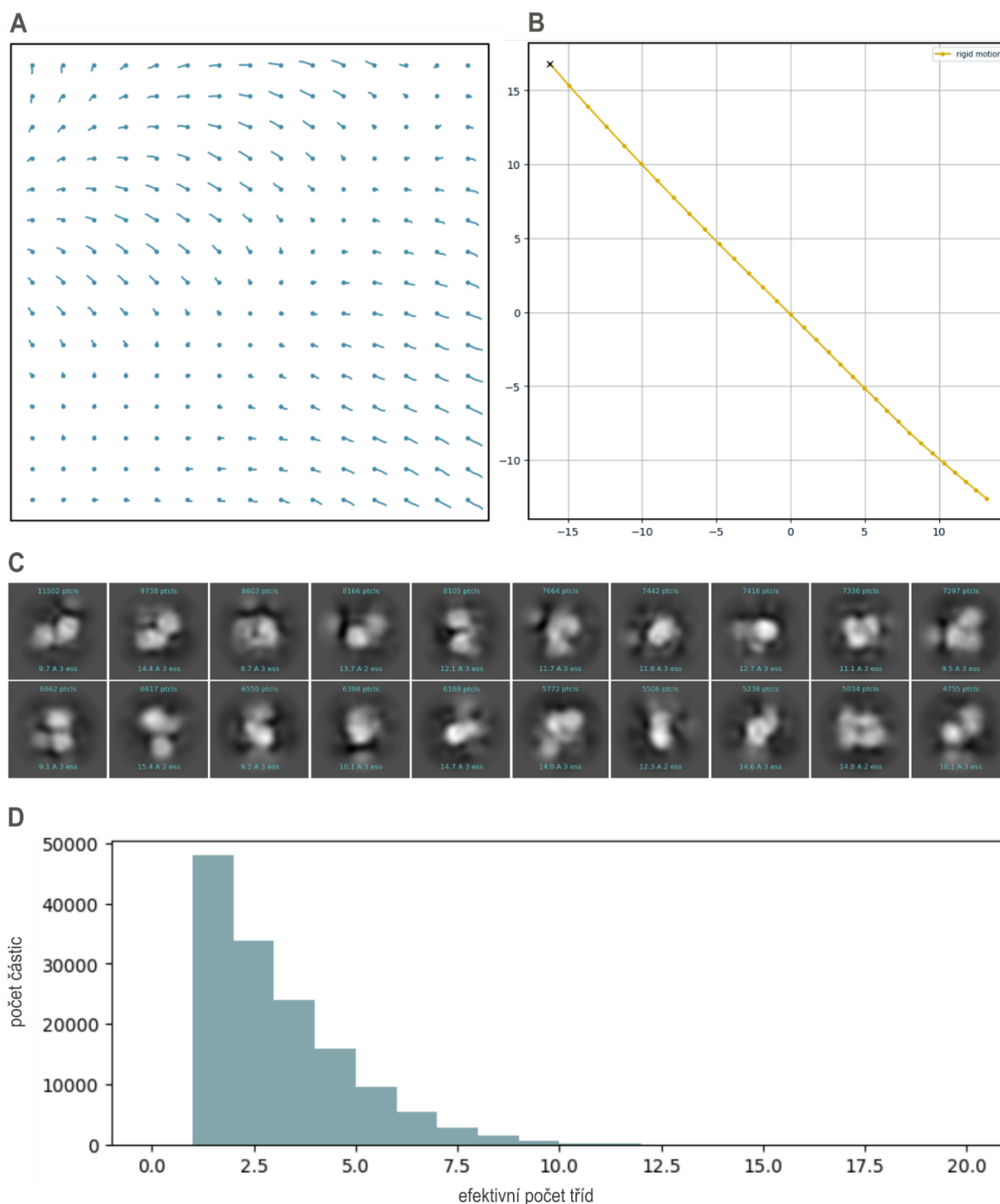


Obrázek 16: Snímky z elektronové mikroskopie komplexu AfGcHK:RR za použití metody negativního barvení. A) Příklad snímku zobrazující světlé částice na tmavém pozadí, které by mohly představovat proteinový komplex AfGcHK:RR. B) „Power spectrum“ snímku (vpravo experimentálně získané spektrum, vlevo programově dopočítané teoretické spektrum). C) CTF snímku – závislost kontrastu na prostorové frekvenci.

či jednotlivé disociované proteiny AfGcHK a RR. V části B obrázku 16, str. 52 je vyobrazeno grafické znázornění Fourierovy transformace příslušného snímku, tzv. „power spectrum“, které určuje kvalitu a rozlišení snímku (v pravé části je zobrazeno experimentálně získané „power spectrum“, zatímco vlevo je programově dopočítané teoretické „power spectrum“). Toto spektrum zachycuje závislost amplitudy na prostorové frekvenci, tedy s jakou intenzitou je na snímku přítomna vlnová funkce o určité frekvenci a směru. Čím je daný pixel světlejší, tím více je přítomna vlnová funkce s příslušnou prostorovou frekvencí. Prostřední část spektra představuje vlnové funkce o nízké frekvenci, a tedy poskytuje informace o hrubších strukturách s nižším rozlišením a směrem k okrajům se frekvence zvyšuje, a proto naopak představují informaci o jemných detailech snímku. Ze získaného spektra je proto patrné, že pořízený snímek (Obrázek 16, část A, str. 52) dosahuje pouze nízkého rozlišení a drobné detaily chybějí.

Dále jsou na spektru patrné opakující se kruhy, tzv. „Thon rings“, které představují grafické znázornění funkce přenosu kontrastu (CTF, z angl. contrast transfer function). Při snímání na elektronovém mikroskopu dochází k tomu, že některé informace (vlnové funkce o určité frekvenci neboli komponenty Fourierovy transformace) jsou na výsledném snímku více nebo naopak méně zastoupeny a jiné zcela ztraceny. To, jakou měrou je kontrast přenesen do výsledného snímku v závislosti na prostorové frekvenci, popisuje právě CTF. Světlé kruhy reprezentují informaci, která je na snímek přenesena, zatímco tmavými kruhy jsou vyobrazeny informace, které scházejí. Graf CTF je zobrazen na obrázku 16, část C, str. 52. Pro vylepšení kvality snímků byla použita funkce korekce CTF v programu CryoSPARC.

Všech 54 videí bylo upraveno funkcí korekce pohybu. Jednalo se o lokální korekci pohybu, která má za cíl vypořádat se s pohybem jednotlivých částic během snímání (Obrázek 17, část A, str. 54) a dále byla použita i korekce celkového pohybu, jenž je způsoben pohybem vzorku zapříčiněným vnějšími vlivy (např. vibracemi z okolí), (Obrázek 17, část B, str. 54). Z takto upravených mikrosnímků bylo vybráno celkem 174 358 částic a následně u nich byla provedena první 2D klasifikace. Vytvořené 2D třídy byly použity jako šablona, podle které byly opět ze všech mikrosnímků vybírány částice, přičemž jich bylo nalezeno 142 189. Z těchto vybraných částic byla vykonána druhá 2D klasifikace, která stanovila celkem 20 tříd představujících jednotlivé pohledy na částici z různých úhlů (Obrázek 17, část C, str. 54). Získané 2D třídy nedosahují uspokojivé kvality a při bližším prozkoumání jednotlivé třídy nepřipomínají tutéž částici

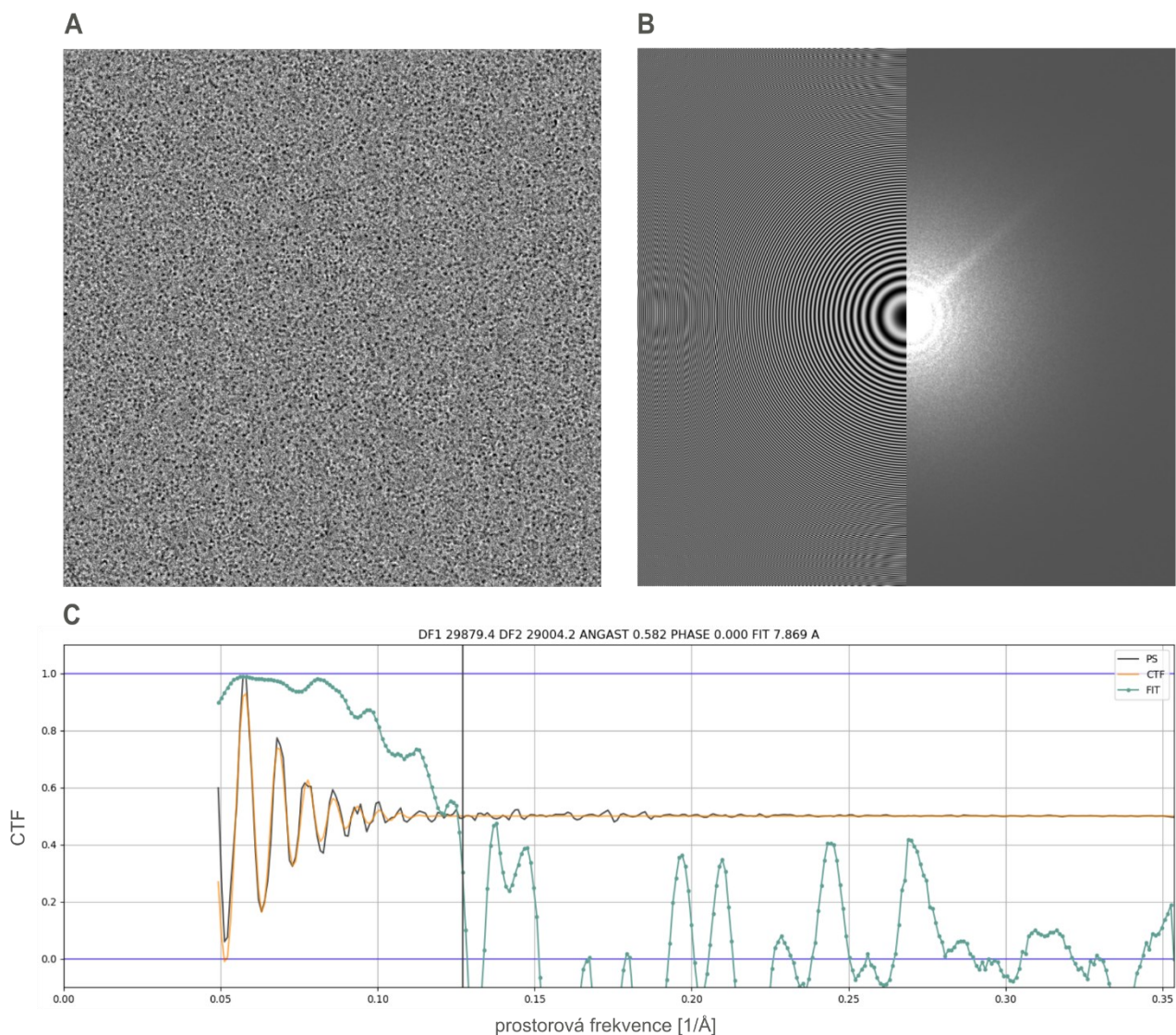


Obrázek 17: Korekce pohybu snímků z elektronové mikroskopie komplexu AfGcHK:RR za použití metody negativního barvení a následná 2D klasifikace selektovaných proteinových částic. A) Lokální korekce pohybu. Na obrázku lze pozorovat trajektorii pohybu jednotlivých bodů snímku. B) Celková korekce pohybu. Na obrázku lze pozorovat trajektorii pohybu celého vzorku. C) 2D klasifikace – z vybraných 142 189 částic bylo vytvořeno celkem 20 tříd představujících jednotlivé pohledy na částici z různých úhlů. D) Graf znázorňující závislost počtu částic na efektivním počtu tříd.

zobrazenou z různých úhlů pohledu. Také o tom svědčí i hodnoty efektivního počtu tříd, které vyjadřují, ke kolika 2D třídám je jedna konkrétní částice přiřazena. V ideálním případě by měla být částice zařazena pouze do jedné třídy a hodnota by měla být 1, v tomto případě však efektivní počet tříd dosahuje u většiny částic vyšších hodnot (Obrázek 17, část D). Jelikož nebyla kvalita 2D tříd dostačující, další kroky procesu rekonstrukce struktury nebyly provedeny.

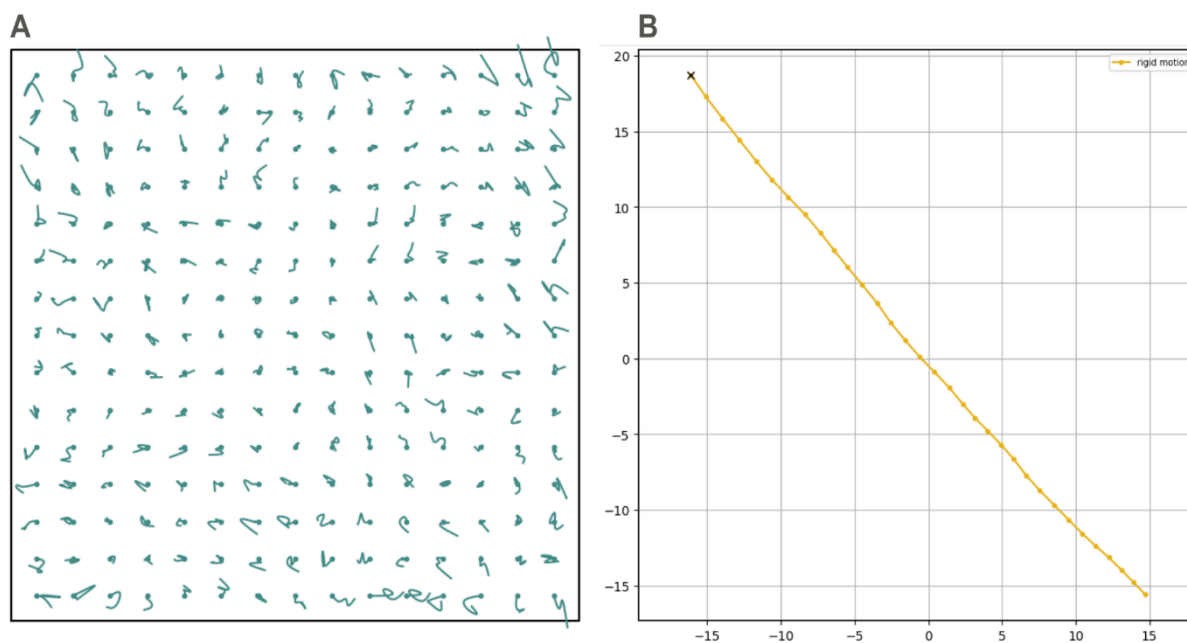
6.4.2 Kryoelektronová mikroskopie komplexu AfGcHK:RR

Navzdory neúspěšné elektronové mikroskopii komplexu AfGcHK:RR metodou negativního barvení byla provedena kryoelektronová mikroskopie. Celkem bylo nasnímáno 271 videí s velikostí pixelu 1,41 Å/px a hodnotou rozostření v intervalu -1,4 až -2,8 μm. Příklad jednoho ze získaných snímků lze vidět na obrázku 18 v části A. Na snímku jsou patrné částice, které by mohly představovat komplex proteinů AfGcHK:RR, případně disociované proteiny AfGcHK a RR. Zvolená koncentrace vzorku 1 mg/ml se zdá být optimální, jelikož hustota částic na snímku je vyhovující pro následující analýzu. V části B obrázku 18 je zobrazeno „power spectrum“ příslušného snímku (na pravé straně se nachází experimentálně získané „power spectrum“, zatímco vlevo je programem dopočítané teoretické „power spectrum“). Stejně jako u metody negativního barvení (kapitola 6.4.1, str. 52) i zde „power spectrum“ naznačuje, že pořízený



Obrázek 18: Snímky z kryoelektronové mikroskopie komplexu AfGcHK:RR. A) Příklad snímku zobrazující jednotlivé částice, které by mohly představovat proteinový komplex AfGcHK:RR. B) Power spectrum snímku (vpravo experimentálně získané spektrum, vlevo programem dopočítané teoretické spektrum). C) CTF snímku – závislost kontrastu na prostorové frekvenci.

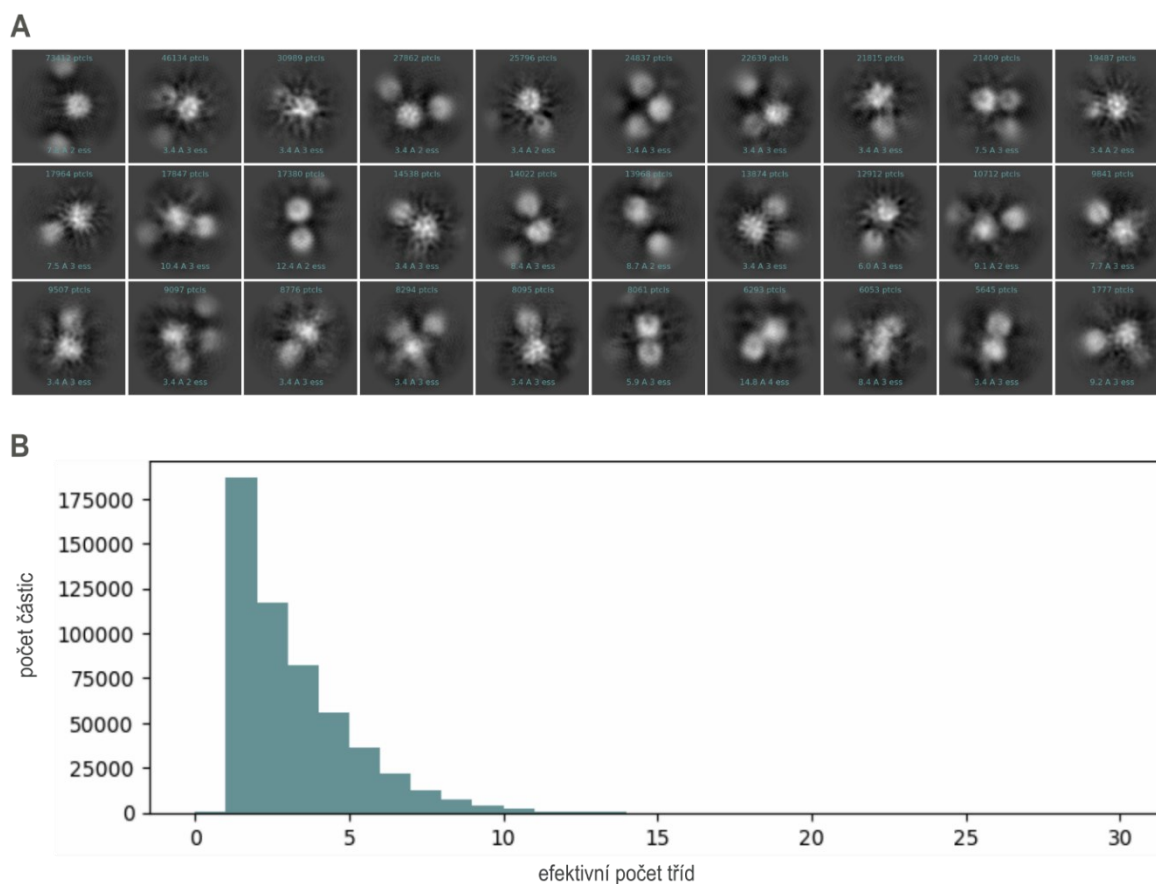
snímek není příliš vysokého rozlišení a také nejsou příliš dobře rozlišeny jednotlivé prstence představující CTF. Graf funkce přenosu kontrastu je zobrazen obrázku 18 v části C, str. 55. Všechny pořízené snímky byly v programu CryoSPARC upraveny pomocí funkce korekce CTF. Dále byla u všech snímků provedena korekce lokálního (Obrázek 19, část A) a celkového pohybu (Obrázek 19, část B).



Obrázek 19: Korekce pohybu snímků z kryoelektronové mikroskopie komplexu AfGcHK:RR. A) Lokální korekce pohybu. Na obrázku lze pozorovat trajektorii pohybu jednotlivých bodů snímku. B) Celková korekce pohybu. Na obrázku lze pozorovat trajektorii pohybu celého vzorku.

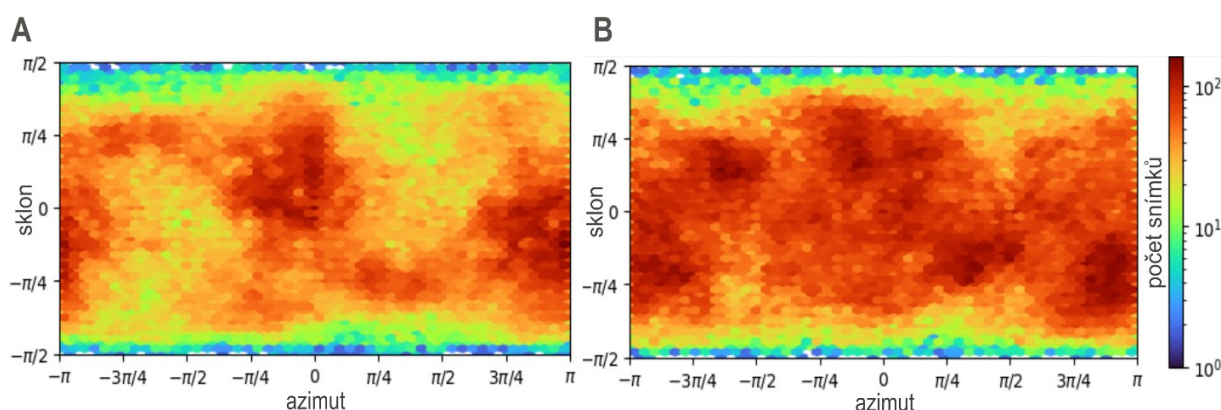
Z upravených 271 videí bylo vybráno celkem 529 036 částic, ze kterých byla provedena 2D klasifikace, jejímž výsledkem bylo 30 tříd představujících zkoumaný objekt z různých úhlů pohledu (Obrázek 20, část A, str. 57). Výsledné 2D třídy vypadají lépe při tomto experimentálním uspořádání než u metody negativního barvení (kapitola 6.4.1, str. 52), nicméně stále nedosahují potřebné kvality a částice nejsou dostatečně odlišeny od pozadí. Na obrázku jsou patrné globulární útvary, jež by mohly představovat jednotlivé domény proteinů, ale nelze s jistotou říct, zda se opravdu jedná o částice proteinového komplexu AfGcHK:RR. Hodnoty efektivního počtu tříd jsou u většiny částic vyšší než jedna a vyjadřují tak, že tyto částice nelze přiřadit pouze k jedné konkrétní 2D třídě (Obrázek 20, část B, str. 57).

Poté byla z částic za pomoci vytvořených 2D tříd provedena *ab initio* 3D rekonstrukce proteinového komplexu AfGcHK:RR následovaná sérií heterogenních a homogenních zpřesnění struktury. Výsledkem jsou dva různé strukturní modely – model A, k jehož vytvoření bylo použito 178 438 částic a model B, utvořený ze 159 931 částic. Na obrázku 21 (str. 57) je zobrazena



Obrázek 20: 2D klasifikace částic komplexu AfGcHK:RR. A) 2D klasifikace – z vybraných 529 036 částic bylo vytvořeno celkem 30 tříd představujících jednotlivé pohledy na částici z různých úhlů. B) Graf znázorňující závislost počtu částic na efektivním počtu tříd.

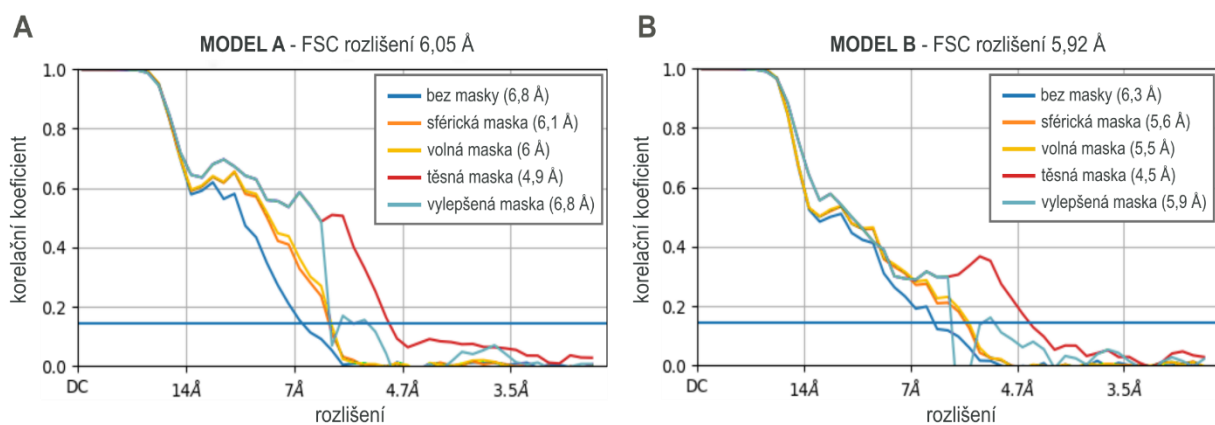
angulární distribuce částic modelu A (část A) a modelu B (část B). Jedná se o transformaci povrchu 3D modelu na 2D plochu (charakterizovanou azimutem a sklonem), na níž je barevně vyznačen počet snímků částic, které přísluší k dané orientaci modelu. Angulární distribuce tedy vyjadřuje, zda jsou ve vzorku rovnoměrně zastoupeny všechny možné orientace částic. Z příložených obrázků vyplývá, že v modelu B je zastoupení všech orientací částic rovnoměrné. V modelu A jsou některé z orientací více preferovány (tmavě červené oblasti) a naopak některé



Obrázek 21: Angulární distribuce částic v modelech komplexu AfGcHK:RR vytvořených na základě kryoelektronové mikroskopie. A) Angulární distribuce částic modelu A. B) Angulární distribuce částic modelu B.

orientaci jsou přítomné méně (zelené oblasti), stále by se však i v případě modelu A dalo zastoupení jednotlivých orientací částic charakterizovat jako poměrně rovnoměrné a žádná z orientací se nezdá být preferována.

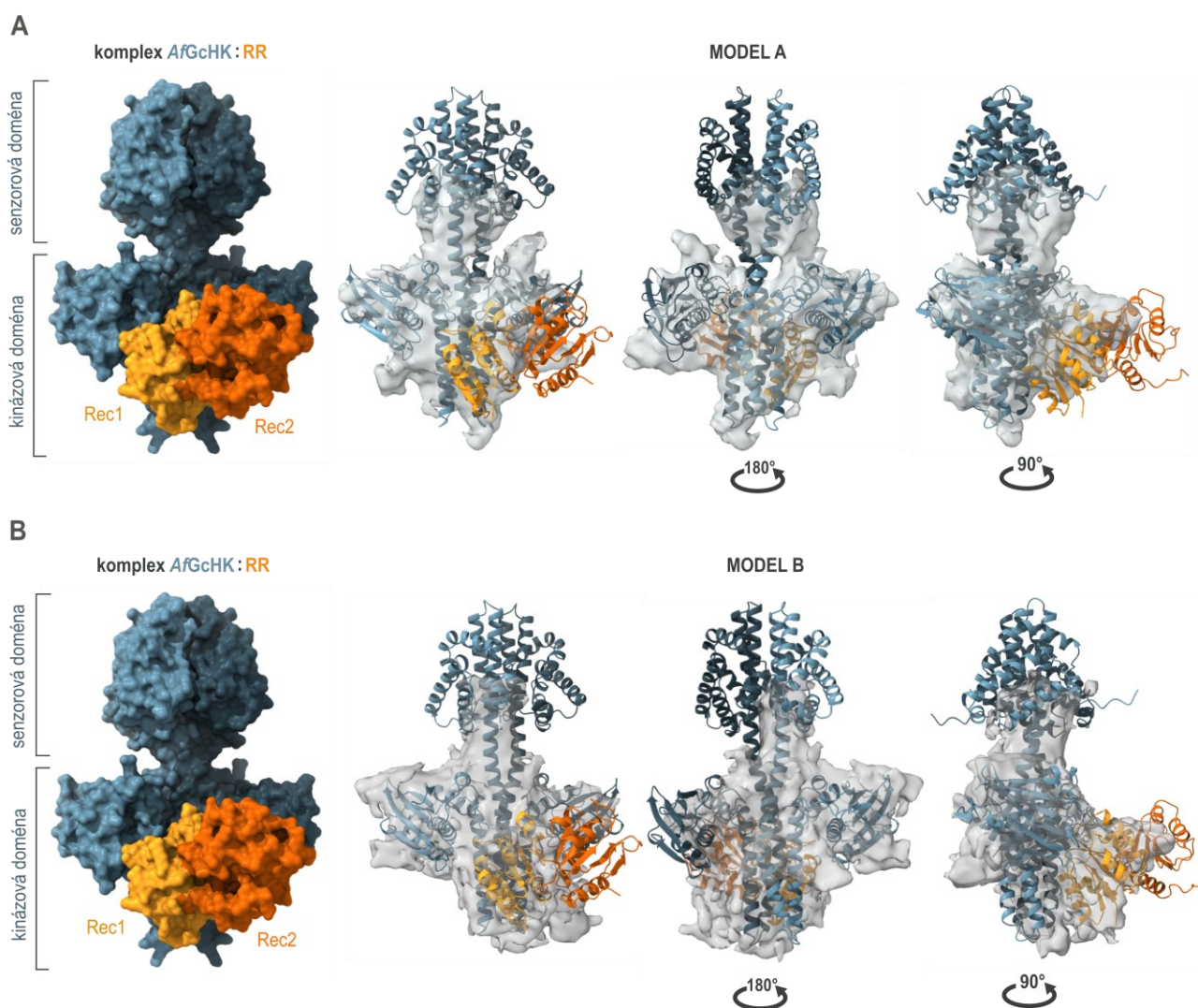
Kvalita rozlišení získaných modelů 3D struktur se určuje na základě tzv. Fourierovy korelace slupek (FSC, z angl. Fourier shell correlation). Jedná se o funkci, která určuje shodu mezi dvěma 3D strukturami, kde každá z nich je sestavena z poloviny náhodně vybraných částic tvořících daný model. Míra shody odpovídá hodnotě korelačního koeficientu, přičemž hodnota 1 značí, že struktury se zcela shodují a hodnota 0 vyjadřuje, že jsou struktury zcela odlišné. Graf FSC představující závislost korelačního koeficientu na rozlišení struktury je zobrazen na obrázku 22 (část A – model A, část B – model B). Barevně jsou rozlišeny křivky pro jednotlivé 3D modely, na které byl programem CryoSPARC aplikován některý druh masky (sférická, volná, těsná a vylepšená⁷⁵ maska), tzn. že byl vybrán pouze určitý objem kolem modelu, aby byl potlačen okolní šum. Rozlišení, které odpovídá hodnotě korelačního koeficientu 0,143 je určeno jako výsledné rozlišení modelu. Pro model A je stanoveno rozlišení 6,05 Å a pro model B 5,92 Å. V ideálním případě by měla mít výsledná křivka sigmoidální tvar, avšak křivky u obou modelů (A i B) sigmoidální tvar nekopírují, proto nelze určená rozlišení u obou modelů považovat za správná.



Obrázek 22: Graf funkce Fourierovy korelace slupek (FSC). Jedná se o funkci, která vyjadřuje shodu mezi dvěma 3D strukturami, kde každá z nich je sestavena z poloviny náhodně vybraných částic tvořících daný model. A) Model A, jehož výsledné rozlišení je 6,05 Å. B) Model B, jehož výsledné rozlišení je 5,92 Å. Vynesené křivky nekopírují sigmoidní tvar, proto určená rozlišení nelze považovat za správná.

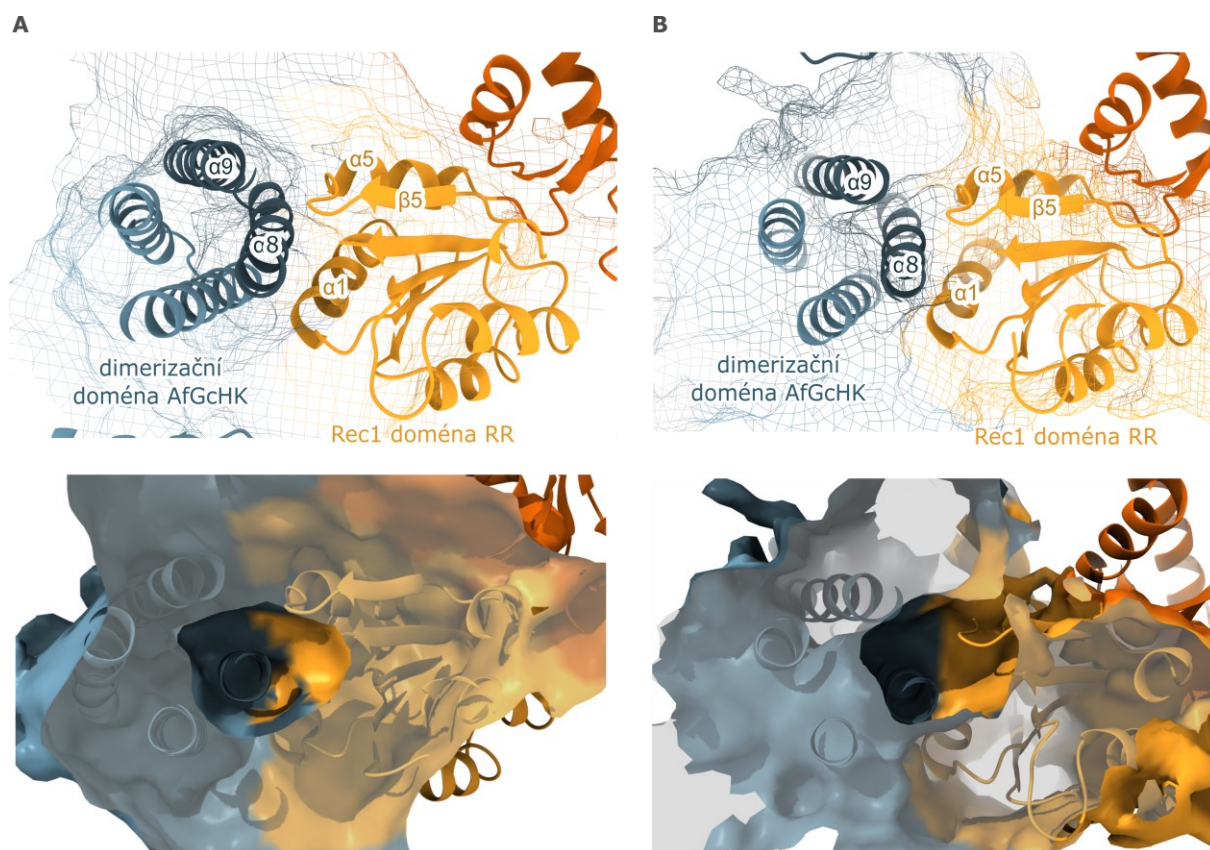
Závěrečným krokem bylo porovnání obou výsledných experimentálních modelů z kryoelektronové mikroskopie s teoretickým modelem komplexu AfGcHK:RR vytvořeným pomocí programu AlphaFold3 (Obrázek 23, str. 59). Proteinový komplex je tvořen homodimerem proteinu AfGcHK (světle a tmavě modrá barva), přičemž každá z podjednotek je tvořena

senzorovou a kinázovou doménou. Druhou komponentou komplexu je protein RR skládající se ze dvou domén Rec1 a Rec2 (žlutá/oranžová barva). Výsledné modely z kryoelektronové mikroskopie jsou vyobrazeny šedou barvou. Jak lze na obrázku 23 pozorovat, oba modely A i B mají nízké rozlišení a odpovídají pouze z části modelu predikované struktury. Korelační koeficient pro shodu modelu A s teoretickým modelem byl stanoven 0,5 a pro model B pouhých 0,42. Nelze proto s jistotou určit, zda byly modely při vyhodnocení zcela správně vzájemně orientovány. U obou modelů téměř chybí část představující sensorovou doménu proteinu AfGcHK, avšak u modelu A je tato část o něco výrazněji přítomna než u modelu B a zčásti tak sensorovou doménu pokrývá. V případě kinázové domény AfGcHK se oba modely A i B shodují s modelem predikované struktury ve větší míře. Jak je na obrázku patrné, překrývají se



Obrázek 23: Grafické porovnání experimentálních modelů z kryoelektronové mikroskopie s teoretickým modelem komplexu AfGcHK:RR vytvořeným pomocí programu AlphaFold3. A) V části A je z různých úhlů zobrazen vzájemný překryv modelu A z kryoelektronové mikroskopie (šedě) s modelem zobrazující predikovanou strukturu komplexu AfGcHK (modře):RR (žlutě/oranžově). B) V části B je z různých úhlů zobrazen vzájemný překryv modelu A z kryoelektronové mikroskopie (šedě) s modelem zobrazující predikovanou strukturu komplexu AfGcHK(modře):RR(žlutě/oranžově). Model představující predikovanou strukturu komplexu AfGcHK:RR byl vytvořen pomocí programu AlphaFold3 a následné grafické porovnání shody mezi jednotlivými modely bylo provedeno v programu ChimeraX ver. 1.9.

v oblastech alfa helixů dimerizačního rozhraní, tak i v oblasti katalytické domény. U proteinu RR je shoda modelů opět nízká, více je pokryta podjednotka Rec1, naopak oblast představující podjednotku Rec2 u modelů A i B téměř chybí (nejlépe patrné na obrázku s pootočením modelu o 90°). Oblast interakce histidinkinázy AfGcHK a RR, která v teoretickém modelu z AlphaFoldu3 zahrnuje $\alpha 8$ a $\alpha 9$ helixy AfGcHK a $\alpha 1$ helix spolu $\alpha 5$ - $\beta 5$ smyčkou RR je v experimentálních modelech z kryoelektronové mikroskopie taktéž přítomna. Navíc se v této oblasti proteinové interakce u obou modelů A i B nachází podobná kavita (Obrázek 24).



Obrázek 24: Oblast interakce proteinů v komplexu AfGcHK:RR - porovnání teoretického modelu z AlphaFoldu3 s experimentálním modelem z kryoelektronové mikroskopie. Interakce mezi jednotlivými komponentami komplexu je zprostředkovávána dimerizační doménou AfGcHK a Rec1 doménou RR, které pokrývá model A (A) i model B (B) z kryoelektronové mikroskopie (zobrazen pohled ze směru sensorové domény AfGcHK). U obou modelu se také v oblasti interakce proteinů nachází kavita. Vytvořeno v programu ChimeraX ver. 1.9.

6.5 Kryoelektronová mikroskopie proteinu AfGcHK-MBP tag

Kryoelektronová mikroskopie proteinu AfGcHK-MBP tag nebyla úspěšná. Pozorovali jsme precipitaci proteinu na rozhraní ledu a vzduchu při přípravě vzorku. Tento problém přetrvával i v případě, že byl do vzorku přidán detergent CHAPSO za účelem omezení precipitace proteinu. Další pokusy kryoelektronové mikroskopie proteinu AfGcHK-MBP tag nebyly z časových důvodů provedeny.

7 DISKUSE

Proteinový komplex bakteriální histidinkinázy AfGcHK a příslušného RR představuje modelového zástupce dvoukomponentních signalizačních systémů, které jsou nedílnou součástí signální transdukce a regulace buněčných pochodů bakterií^{1,11,48}. Úlohou komplexu AfGcHK:RR je detekovat, zda se bakterie nachází v aerobním či anaerobním prostředí a následně vyvolat adekvátní buněčnou odpověď. Molekuly kyslíku jsou detekovány hemem sensorové domény histidinkinázy^{2,67}, přičemž v případě AfGcHK se jedná o sensorovou doménu tvořenou globinovým motivem⁷⁰. To ji dělá unikátní mezi ostatními zástupci histidinkináz, jelikož žádná z doposud identifikovaných histidinkináz neobsahuje kombinaci globinové sensorové domény s funkční doménou vykazující kinázovou aktivitu².

Dvoukomponentní signalizační systémy se vyskytují i u patogenních mikroorganismů, což je důvodem jejich intenzivního výzkumu v poslední letech, s cílem využít získané poznatky při vývoji nových léčiv. Tyto signalizační systémy se podílejí na regulaci velkého množství esenciálních metabolických drah a buněčných procesů, včetně regulace virulence bakterií a vzniku antibiotické rezistence. Díky těmto vlastnostem jsou považovány za vhodné potenciální cíle terapeutického zásahu v boji proti bakteriálním infekcím^{76,77}. Pro vývoj nových léků zaměřených na dvoukomponentní signalizační systémy je nezbytné nejprve podrobně pochopit jejich strukturu a mechanismus fungování. Proto je předmětem této práce využitím moderních technik určit strukturu a mechanismus přenosu signálu komplexu AfGcHK:RR, jakožto modelového zástupce dvoukomponentních signalizačních systémů.

V první části experimentální práce byly připraveny rekombinantní proteiny AfGcHK-His tag, RR-His tag a AfGcHK-MBP tag heterologní expresí v buňkách BL-21 (DE3) *E. coli*. Hodnoty výsledných výtěžků buněk *E.coli* obsahující exprimované proteiny (kapitola 6.1.1, str. 44) se u všech třech zmíněných proteinů výrazně neliší a jsou srovnatelné s výtěžky v předchozích studiích⁷⁸⁻⁸⁰. V případě finálních preparátů dosahoval nejvyšší koncentrace i výtěžku protein AfGcHK-His tag, přičemž tyto hodnoty jsou vyšší i v porovnání s dalšími studiemi⁸⁰⁻⁸². Koncentrace finálního preparátu AfGcHK-MBP tag byla srovnatelná s koncentrací izolovaného AfGcHK-His tag. Finální preparát proteinu RR-His tag byl izolován s nižším výtěžkem i nižší koncentrací oproti proteinu AfGcHK-His tag, přesto byly tyto hodnoty plně dostačující pro další experimenty (kapitola 6.1.2, str. 44). Navzdory nižšímu výtěžku proteinu RR-His tag, čistota jeho finálního preparátu činila 99 %. Naopak proteiny AfGcHK-His tag a AfGcHK-MBP tag dosahovaly sice vysokých výtěžků, ale čistota těchto preparátů byla nižší než

u RR-His tag. Právě snížená čistota finálních preparátů může být jedním z důvodů, proč se nepodařilo získat model struktury komplexu *AfGcHK:RR* pomocí kryoelektronové mikroskopie ve vyšší kvalitě a rozlišení. Přítomnost dalších balastních proteinů ve finálním preparátu způsobuje nízkou homogenitu částic ve vzorku snímaném kryoelektronovým mikroskopem, což zásadně zhorší zpracování výsledných dat. Stejný problém se objevuje i v případě *AfGcHK-MBP* tag, u kterého byla pozorována nejnižší čistota ze všech finálních preparátů proteinů, jež s největší pravděpodobností zcela znemožnila rekonstrukci modelu z nasnímaných dat z kryoelektronové mikroskopie.

Před plánovanými strukturními studiemi bylo ověřeno, že je komplex proteinů *AfGcHK-His* tag a *RR-His* tag enzymově aktivní a skutečně v přítomnosti ATP dochází k autofosforylační reakci v rámci *AfGcHK* a následnému přenosu fosforylové skupiny na *RR* (Obrázek 12, část A, str. 48). V provedené analýze je patrná separace fosforylovaných forem proteinů od nefosforylovaných, což potvrzuje probíhající autofosforylační a fosfotransferázovou reakci. U *RR* došlo k oddělení dokonce dvou fosforylovaných forem proteinu, u kterých bylo na základě předchozí studie^{2,83} určeno, že se jedná o monofosforylované formy *RR* na aspartátovém zbytku D52 nebo D169. Rozdílem oproti dříve provedeným experimentům^{2,83,84} je chybějící třetí identifikovaná difosforylovaná forma *RR*. Při podrobném prozkoumání záznamu provedené analýzy (Obrázek 12, část A, str. 48) se zdá, že by tato difosforylovaná forma *RR* mohla mít velmi podobnou mobilitu jako nefosforylovaná forma *AfGcHK*, tedy že difosforylovanou formu *RR* představují pruhy s velmi nízkou intenzitou nacházející se těsně pod nefosforylovanou formou *AfGcHK*. Tuto hypotézu ovšem vyvrací druhá analýza stejných vzorků, ve které nedošlo k oddělení jednotlivých fosforylovaných forem z důvodu záměny manganatých iontů za hořečnaté (Obrázek 12, část B, str. 48). Na získaném záznamu analýzy je totiž patrné, že se v něm zmíněné velmi světlé pruhy nacházejí také, tudíž nemůžou představovat difosforylovanou formu *RR*. Jelikož při této druhé analýze s přidáním hořečnatými ionty namísto manganatých iontů nedochází k oddělení fosforylovaných forem proteinů od nefosforylovaných forem, lze usuzovat, že manganaté ionty jsou nezbytně nutné pro vytvoření Phos-tag značky, která způsobuje odlišnou mobilitu fosforylovaných forem proteinů v gelu.

Druhým možným vysvětlením absence difosforylované formy *RR* v analýze enzymové aktivity komplexu *AfGcHK:RR* pomocí Phos-tag elektroforézy (Obrázek 12, část A, str. 48) je totožná mobilita difosforylované formy *RR* s mobilitou nefosforylované formy *AfGcHK*, a ve výsledku se tyto formy vzájemně překrývají. Tuto hypotézu podporuje i fakt, že intenzita

nefosforylované formy *A/GcHK* zůstává se zvyšujícím se časem inkubace stále stejná, přitom by mělo docházet k jejímu poklesu z důvodu postupného přetváření na fosforylovanou formu. Právě tato konstantní intenzita by mohla být způsobena překryvem ubývající nefosforylované formy *A/GcHK* a narůstající difosforylované formy RR. V potaz bychom však měli brát i to, že po autofosforylační reakci probíhá přenos fosforylové skupiny z *A/GcHK* na RR, tedy *A/GcHK* přechází zpět na nefosforylovanou formu, což může být rovněž důvodem pro konstantní intenzitu nefosforylované formy *A/GcHK* v čase. V předchozích studiích byl namísto RR s histidinovou kotvou použit RR obsahující kotvu glutathion-S-transferázy (GST tag). Jelikož má RR-GST tag vyšší molekulovou hmotnost, a tedy i nižší mobilitu v gelu než *A/GcHK*, mají jednotlivé formy proteinů rozdílné uspořádání oproti experimentu v této práci, což eliminuje možnost vzájemného překryvu. V této práci byl použit RR-His tag namísto RR-GST tag kvůli co nejmenšímu ovlivnění funkce proteinu navázanou kotvou, ale z důvodu pravděpodobného překryvu některých forem proteinů se zdá být toto použití nevhodné. Řešením by mohlo být použití jiného složení gelu, ve kterém by došlo k lepšímu rozlišení jednotlivých forem proteinů.

V této práci, stejně jako v předchozích experimentech^{2,83,84}, je na záznamu analýzy enzymové aktivity komplexu *A/GcHK:RR* v čase pomocí Phos-tag elektroforézy patrné, že v krátkých inkubačních časech dochází v rámci fosfotransferázové reakce nejdříve k fosforylaci aspartátového zbytku D52 (Obrázek 12, část A, str. 48). Později se objevuje i forma RR s fosforylovaným aspartátovým zbytkem D169 a v předchozích studiích je přítomna také difosforylovaná forma na D52 a D169^{2,83,84}. Pomocí nepřímé metody HDX-MS bylo identifikováno, že RR interaguje s histidinkinázou *A/GcHK* prostřednictvím své Rec1 domény⁶⁵. Jako možné vysvětlení přednostní fosforylace D52 autoři navrhuji, že Rec1 doména proteinu RR obsahující D52 má vyšší afinitu k *A/GcHK* než Rec2 doména (obsahující D169). Zároveň přednostní fosforylace na D52 může způsobit změnu struktury celého proteinu vedoucí k lepší přístupnosti Rec2 domény k *A/GcHK*. Výsledky prezentované v předkládané práci (Obrázek 12, část A, str. 48) toto vysvětlení podporují a jsou s ním v souladu.

V programu AlphaFold3 byl vytvořen teoretický model struktury komplexu *A/GcHK:RR* (Obrázek 13, str. 49) za účelem jeho porovnání se získaným experimentálním modelem komplexu z kryoelektronové mikroskopie. Výsledný teoretický model koresponduje se závěry předchozích studií, které identifikovaly, že histidinkináza *A/GcHK* je tvořena globinovou sensorovou doménou a funkční kinázovou doménou, jež jsou vzájemně propojeny flexibilním úsekem^{2,65}. Ve zde uvedeném modelu je tento flexibilní úsek charakterizován jako prodloužený α helix, který propojuje $\alpha 9$ helix kinázové domény a $\alpha 7$ helix sensorové domény, zatímco

v modelech z předchozích studií byly domény propojeny nestrukturovaným aminokyselinovým úsekem^{65,66}. Struktura sensorové domény, jež byla dříve identifikována rentgenovou krystalografií⁷⁰, v modelu dosahuje vysokých hodnot pLDDT, můžeme tedy předpokládat, že byla určena s vysokou přesností. Při porovnání teoretického modelu z AlphaFold3 a struktury získané rentgenovou krystalografií jsou struktury sensorových domén téměř identické, jediné drobné rozdíly se nacházejí v oblasti vazebného místa molekuly hemu. Lehký posun α helixů obklopujících hem může být způsoben rozdílnou koordinační strukturou hemu, u které je v případě struktury určené rentgenovou krystalografií přítomný CN^- jako šestý ligand iontu železa, zatímco při tvorbě modelu v AlphaFoldu3 byl jako vstupní parametr zadán pouze hem bez navázaného ligandu (kapitola 5.5, str. 40). Dále byly v teoretickém modelu struktury z AlphaFoldu3 dle hodnot pLDDT s vysokou přesností určeny struktury katalytických domén *AfGcHK* a vnitřní struktury Rec domén RR, pravděpodobně z důvodu vysoké konzervovanosti struktur. Tyto zmiňované struktury jsou téměř identické se strukturami příslušných domén v modelech z předchozích studií^{65,66}. Nejméně přesnými strukturami v modelu (dle pLDDT) je spojení sensorové a kinázové domény *AfGcHK* a oblast ATP víka v katalytické doméně *AfGcHK*, které u histidinkináz představuje flexibilní úsek, jenž mění svou konformaci v závislosti na tom, zda je v katalytické doméně navázaný nukleotid^{27,28}. Vysoká flexibilita proteinových segmentů může způsobit obtížnou predikci jejich prostorového uspořádání, proto nízká přesnost oblasti spojení sensorové a kinázové domény a ATP víka podporuje zjištění, že se jedná o vysoce flexibilní struktury^{27,28,65}.

Způsob propojení a vzájemná orientace katalytické a dimerizační domény v kinázové funkční doméně určuje, zda probíhá autofosforylace v histidinkináze *cis* nebo *trans* mechanismem⁶¹. V teoretickém modelu struktury komplexu *AfGcHK:RR* z předchozí studie je svazek helixů v dimerizační doméně levotočivý⁶⁵, tudíž dochází k přiblížení katalytické a dimerizační domény v rámci jednoho monomeru a autofosforylace by měla probíhat *cis* mechanismem. Toto vzájemné uspořádání domén je pravděpodobně způsobeno použitím histidinkinázy HK853 *T. maritima* jako předlohy pro modelování struktury kinázové domény *AfGcHK*, která má levotočivé uspořádání helixů v dimerizační doméně a vykazuje *cis* mechanismus autofosforylace⁶². Naopak v teoretickém modelu z AlphaFoldu3 vytvořeném v experimentální části této práce je svazek helixů dimerizační domény pravotočivý, tudíž se katalytická doména (obsahující vazebné místo pro ATP) z jednoho monomeru přibližuje k dimerizační doméně (obsahující His183) z druhého monomeru (Obrázek 13, část B, str. 49). V tomto případě by měla autofosforylace v komplexu *AfGcHK:RR* probíhat *trans* mechanismem,

což koresponduje s nedávno provedenou studií zaměřenou na autofosforylační mechanismus histidinkinázy *A/GcHK*⁸⁰.

Celková přesnost modelu predikované struktury komplexu *A/GcHK:RR* byla určena na základě hodnoty pTM, která činí 0,55. Skóre pTM může nabývat hodnot mezi 0–1, přičemž za spodní hranici, při které se dá model z hlediska přesnosti akceptovat, se považuje hodnota 0,5⁷³. Z toho vyplývá, že vytvořený model s pTM 0,55 je použitelný, ale nedosahuje příliš velké přesnosti. Hodnota ipTM stanovující přesnost interakce jednotlivých domén činí 0,5 a nachází se pod spodní hranicí ipTM 0,6, pod kterou nelze z hlediska této hodnoty model akceptovat⁷³. Nízké hodnoty pTM a ipTM jsou pravděpodobně způsobeny flexibilními úseky spojujícími jednotlivé domény. Ty jsou také důvodem, proč se doposud nepodařilo objasnit strukturu histidinkinázy *A/GcHK* v plné délce přímými metodami. Z grafů PAE (Obrázek 14, str. 50 a Obrázek 15, str. 51) je patrné, že i přes stanovenou nízkou hodnotu ipTM probíhá mezi některými doménami interakce, tudíž výsledný model nemusí být zcela nepřesný. V teoretickém modelu z AlphaFoldu3 se $\alpha 6$ a $\alpha 7$ helixy jednotlivých monomerů sensorových domén nacházejí v těsné blízkosti a vytvářejí tak svazek čtyř α helixů, který byl na základě hodnot PAE určen s vysokou přesností. To je v souladu se zjištěním, že interakce v tomto svazku α helixů jsou zodpovědné za vznik homodimeru⁷⁰.

Pro tuto práci je nejzajímavější oblast interakce *A/GcHK* a RR, která byla v modelu jako celek dle hodnot PAE určena s nízkou přesností. Přesto se v této oblasti nacházejí úseky s nižšími hodnotami PAE, tedy vyšší přesností. Jedná se o struktury C-konce $\alpha 8$ helixu a N-konce $\alpha 9$ helixu dimerizační domény *A/GcHK* a oblast $\alpha 1$ helixu, $\alpha 5$ helixu, $\beta 5$ listu a $\alpha 5$ - $\beta 5$ smyčky Rec1 domény RR (Obrázek 15, str. 51). Některé z těchto struktur byly již také určeny jako místo interakce *A/GcHK* a RR na základě HDX-MS, jedná se o C-konec $\alpha 8$ helixu *A/GcHK*, který interaguje s $\alpha 5$ helixem a $\beta 6$ listem RR a N-konec $\alpha 9$ helixu *A/GcHK* interagující s $\alpha 1$ helixem a $\beta 2$ listem RR⁶⁵. V komplexu HK853 a RR468 *T. maritima*, u kterého byla struktura stanovena rentgenovou krystalografií a představuje proto model interakce komplexu histidinkinázy a RR, je interakce jednotlivých komponent komplexů zprostředkována pomocí dvou helixů dimerizační domény HK853 a $\alpha 1$ helixu a $\alpha 5$ - $\beta 5$ smyčky RR468⁶². V teoretickém modelu z AlphaFoldu3 se zmíněné $\alpha 8$ a $\alpha 9$ helixy *A/GcHK* a $\alpha 1$ helix spolu $\alpha 5$ - $\beta 5$ smyčkou RR nacházejí v takové pozici, která umožňuje vzájemnou interakci. Vyšší přesnost prostorového uspořádání těchto struktur dle hodnot PAE podporuje zjištění, že jsou tyto struktury opravdu zodpovědné za vzájemnou interakci komponent v komplexu histidinkinázy a RR^{62,65}.

Aby bylo možné lépe a do větších detailů prozkoumat interakci histidinkinázy *AfGCHK* s příslušným RR, byla provedena kryoelektronová mikroskopie za účelem získání experimentálního modelu struktury příslušného komplexu proteinů. Součástí zpracování dat bylo rozřazení všech nasnímaných částic do několika tříd představujících komplex z různých úhlů pohledu, tzv. 2D klasifikace. V případě negativního barvení i klasické kryoelektronové mikroskopie nedosahují jednotlivé třídy v 2D klasifikaci příliš uspokojivé kvality (Obrázek 17, část C, str. 54; Obrázek 20, část A, str. 57). Celkově jsou částice představující konkrétní třídy rozmazané a bez přítomnosti detailnějších struktur, a také nejsou příliš dobře odděleny od pozadí (především u metody negativního barvení), které je zrnité a obsahuje šum. Tomu odpovídají i vysoké hodnoty efektivního počtu tříd (Obrázek 17, část D, str. 54; Obrázek 20, část B, str. 57). U obou 2D klasifikací lze pozorovat, že je velký poměr tříd tvořen částicemi s třemi globulárními útvary podobné velikosti, které by teoreticky mohly představovat sensorovou doménu *AfGCHK*, kinázovou doménu *AfGCHK* a RR, jenž mají vzájemně podobnou molekulovou hmotnost^{72,85}. Způsobem uspořádání tyto tři útvary připomínají spíše vzájemnou pozici homodimeru sensorové domény a dvou katalytických domén *AfGCHK*. Nicméně jako celek částice 2D tříd nevykazují příliš velkou podobnost ve srovnání se strukturou komplexu *AfGCHK:RR* v teoretickém modelu z AlphaFold3 z této práce či z předchozích studií^{65,66}, proto lze předchozí tvrzení považovat pouze za velmi nejisté odhady.

I přes nízkou kvalitu vytvořených tříd v 2D klasifikaci byla z nasnímaných částic provedena 3D rekonstrukce komplexu *AfGCHK:RR*. Výsledkem jsou dva modely A a B, u kterých bylo na základě FSC určeno výsledné rozlišení 6,05 Å pro model A a 5,92 Å pro model B. Na základě tvaru křivek v FSC grafu (Obrázek 22, str. 58), jež nekopírují sigmoidální tvar, lze říct, že stanovené rozlišení modelů není přesné. I při samotném pohledu na výsledné modely komplexu (Obrázek 23, str. 59) je patrné, že jejich rozlišení je mnohem nižší oproti určeným hodnotám. Výsledek v podobě více než jednoho modelu při 3D rekonstrukci může být způsoben heterogenitou vzorku, který obsahuje různé strukturní varianty proteinového komplexu. Jelikož má komplex *AfGCHK:RR* nízkou disociační rovnovážnou konstantu (18 μM)⁶⁵, je interakce mezi jednotlivými komponentami poměrně slabá a postupné rozpadání komplexu může způsobit zmíněnou heterogenitu analyzovaného vzorku. Druhým možným vysvětlením vytvoření dvou výsledných modelů A a B je výskyt více konformací komplexu ve vzorku. Při přechodu na aktivní formu histidinkinázy *AfGCHK* pravděpodobně dochází ke změně konformace proteinu pohybem jednotlivých domén vůči sobě nůžkových mechanismem⁶⁶. Analyzovaný vzorek proteinového komplexu obsahuje pouze aktivní formu histidinkinázy

obsahující hem s Fe^{3+} iontem, tudíž by ke změně konformace z důvodu přechodu na aktivní formu nemělo docházet. Další změna konformace komplexu by mohla nastat v důsledku fosforylace histidinového zbytku v AfGcHK a aspartátových zbytků RR. Proběhnutí fosforylačních reakcí je však podmíněno přítomností ATP, které při přípravě proteinového komplexu přidáno do směsi nebylo, tudíž ani toto vysvětlení nepodporuje přítomnost více konformací ve vzorku. Třetím důvodem, který může způsobit výstup v podobě dvou modelů komplexu, je nejednoznačné vyhodnocení dat programem. Jelikož samotná 2D klasifikace dosahuje nízké kvality a výsledné modely mají podobnou strukturu a velmi nízké rozlišení, je velmi pravděpodobné, že interpretace získaných dat byla pro program velmi obtížná, a ve výsledku vznikly dva modely představující dvě možné struktury proteinového komplexu.

Závěrečným krokem bylo porovnání výsledných modelů komplexu AfGcHK:RR z kryoelektronové mikroskopie s teoretickým modelem struktury z programu AlphaFold3 (Obrázek 23, str. 59). Při takto nízké kvalitě a rozlišení je zarovnání teoretického modelu do hustotní mapy z kryoelektronové mikroskopie velmi obtížné a nepřesné. Pro model A i B bylo provedeno zarovnání tak, aby bylo dosaženo co nejvyšších hodnot korelačních koeficientů, přesto se podařilo dosáhnout pouze hodnot 0,5 u modelu A, u modelu B dokonce pouze 0,42 (rozsah hodnot korelačních koeficientů se pohybuje mezi 0–1, přičemž 1 představuje úplnou shodu a 0 žádnou shodu). Tyto hodnoty svědčí o tom, že se jedná pouze o malou shodu mezi experimentálně získanými modely z kryoelektronové mikroskopie a teoretickým modelem z AlphaFoldu3. Navíc při takto nízkých hodnotách korelačních koeficientů nelze s jistotou říct, že zarovnání modelů proběhlo správně. Pokud bychom i přesto chtěli porovnat získané teoretické a experimentální modely komplexu, lze pozorovat, že dochází k překryvu velké části oblasti dimerizační a katalytické domény AfGcHK a menšímu překryvu oblasti Rec1 domény RR. Naopak sensorová doména v obou modelech z kryoelektronové mikroskopie téměř chybí, stejně tak i Rec2 doména RR. V teoretickém modelu z AlphaFoldu3 i v modelu z předešlé studie⁶⁵ je interakce mezi jednotlivými komponentami komplexu zprostředkována dimerizační doménou AfGcHK a Rec1 doménou RR. Tyto oblasti interakce se nacházejí v obou experimentálních modelech z kryoelektronové mikroskopie (Obrázek 24, str. 60), čímž podporují teorii, že se tyto struktury podílejí na interakci mezi AfGcHK a RR. Avšak s tak nízkou kvalitou a rozlišením získaného experimentálního modelu nelze pronést žádné jisté závěry. Zajímavostí je, že v místě interakce experimentálních modelů A i B se nacházejí podobné kavity (Obrázek 24, str. 60), ačkoliv se bude v obou případech spíše jednat o oblast s chybějící hustotou z důvodu nízkého

rozlišení modelů. Nicméně podobné umístění této kavity v modelech A a B by alespoň mohlo poukazovat na totožné zarovnání modelů vzhledem k teoretickému modelu z AlphaFoldu3.

Jelikož mají výsledné modely z kryoelektronové mikroskopie příliš nízké rozlišení a nepokrývají celý komplex *AfGcHK:RR*, nelze diskutovat další podrobnosti ohledně interakce proteinů a mechanismu přenosu fosforylové skupiny z *AfGcHK* na *RR*. Důvodů, proč se nepodařilo získat model v lepší kvalitě, může být několik. První překážkou úspěšné rekonstrukce struktury je nízká molekulová hmotnost komplexu *AfGcHK:RR* a to pouhých 117 kDa^{71,72}. Dříve byla kryoelektronová mikroskopie použitelná pro určení struktury pouze velkých proteinových komplexů, avšak díky pokročilým technologiím lze v dnešní době analyzovat strukturu i mnohem menších komplexů. Bez jakýchkoliv pomocných technik byly úspěšně analyzovány proteiny s molekulovou hmotností pod 200 kDa, například polymeráza SARS-CoV NSP12 (131 kDa)⁸⁶, přenašeč TmrAB (151 kDa)⁸⁷ nebo cytochrom-bd-I-oxidáza (113 kDa)⁸⁸. Dokonce se podařilo získat strukturu i mnohem menších biomolekul, jakými jsou hemoglobin (64 kDa)⁸⁹ či streptavidin (52 kDa)⁹⁰, a prozatím nejmenší identifikovanou strukturou pomocí konvenční kryoelektronové mikroskopie je SAM-IV „riboswitch“ s molekulovou hmotností pouhých 39 kDa⁹¹. Avšak analýza takto malých struktur je stále velmi obtížná a vyžaduje pokročilé technologie, dobrou optimalizaci a následně pokročilé zpracování dat. Proto může být nízká molekulová hmotnost komplexu *AfGcHK:RR* jedním z důvodů, proč je získaný model struktury komplexu zatížen tak velkou chybou a nepřesností. Snímání vzorků proteinového komplexu *AfGcHK:RR* bylo provedeno na elektronovém mikroskopu JEOL, JEM-2100Plus, jehož parametry zodpovědné za výslednou kvalitu snímků nejsou srovnatelné s nejlepšími elektronovými mikroskopy typu Titan Krios. Mikroskop JEOL, JEM-2100Plus byl v této práci použit pro prvotní pokusy o vytvoření modelu komplexu, a teprve až v případě úspěchu by bylo provedeno snímání na mikroskopu Titan Krios, s kterým by pravděpodobně bylo možné dosáhnout vyššího rozlišení modelu.

Dalšími možnými překážkami v získání modelu s vyšším rozlišením může být nízká rigidita komplexu způsobená flexibilními úseky propojující jednotlivé proteinové domény a celková asymetrie komplexu v důsledku uspořádání ve stechiometrickém poměru 2:1 (*AfGcHK:RR*)⁶⁵. Problém s nízkou molekulovou hmotností a asymetrií komplexu *AfGcHK:RR* měl být eliminován v další části experimentu, který zahrnoval identifikaci struktury kryoelektronovou mikroskopií samotného homodimeru *AfGcHK-MBP* tag, jenž je symetrický, a navíc je celková molekulová hmotnost navýšena MBP kotvou a činí 170 kDa^{71,72}. Snímání v tomto případě bylo zcela neúspěšné, kvůli precipitaci proteinů na rozhraní ledu a vzduchu

ve vzorku. Tento problém se dá vyřešit optimalizací přípravy vzorků, například přidáním detergentů. V případě proteinu *AfGcHK*-MBP tag nemělo použití detergentu CHAPSO výrazný účinek na omezení precipitace proteinu. V důsledku neúspěšného vytvoření modelu *AfGcHK*-MBP tag nelze více diskutovat, zda je v případě komplikované rekonstrukce struktury komplexu *AfGcHK*:RR na vině pouze asymetrie a nízká molekulová hmotnost nebo se problém nachází i v jiných aspektech, např. flexibilitě, přípravě a zpracování vzorku nebo konečné analýze získaných dat.

Společně s novými vylepšenými zobrazovacími zařízeními^{92,93} a postupy pro přípravu vzorku⁹⁴ byly v posledních letech vyvinuty další inovativní přístupy, které značně zjednodušují identifikaci struktur malých biomolekul. Jedním z přístupů je použití fragmentů protilátek, které navýší celkovou molekulovou hmotnost proteinu, dále mohou uzamknout protein v určité konformaci, čímž sníží jeho flexibilitu, a také pro svou známou a dobře rozeznatelnou strukturu slouží jako značka, která usnadňuje program vzájemné zarovnání částic při analýze dat⁹⁵. Podobné využití mají v kryoelektronové mikroskopii i tzv. nanotělíška či megatělíška⁹⁶. Účinnou metodou je i využití proteinových lešení (z angl. protein scaffold), na které je navázáno několik kopií analyzované biomolekuly a společně vytváří symetrickou a rigidní strukturu s jasnou orientací biomolekul⁹⁷. Použití těchto moderních přístupů by mohlo být dobrým nástrojem pro lepší identifikaci struktury komplexu *AfGcHK*:RR, která by pomohla objasnit mechanismus signální transdukce mezi jednotlivými komponentami komplexu. Každý nový získaný poznatek o fungování bakteriálních organismů může posunout stávající výzkum kupředu a pomoci ve vývoji nových nástrojů v medicíně i biotechnologickém průmyslu.

8 ZÁVĚR

Cíle předkládané diplomové práce byly v zásadě naplněny. Byly splněny čtyři z pěti stanovených cílů.

- Úspěšně byly připraveny rekombinantní proteiny *A/GcHK*-His tag o koncentraci 71,4 mg/ml a RR-His tag o koncentraci 7,5 mg/ml. Výtěžek buněk *E. coli* obsahujících protein *A/GcHK*-His tag činil 19,2 g a výtěžek buněk obsahujících RR-His tag činil 24,4 g. Celkový výtěžek proteinů činil 18,6 mg v případě proteinu *A/GcHK*-His tag a 4,9 mg v případě RR-His tag. Dále byl úspěšně připraven protein *A/GcHK*-MBP tag, u kterého byla pro následující experimenty použita pouze frakce s nejvyšší koncentrací 9,98 mg/ml. Výsledný výtěžek buněk *E.coli* obsahujících protein *A/GcHK*-MBP tag činil 16,3 g.
- Pomocí Phos-tag elektroforézy bylo ověřeno, že komplex proteinů *A/GcHK*-His tag a RR-His tag je enzymově aktivní a probíhá v něm autofosforylační a fosfotransferázová reakce. Přednostně dochází k přenosu fosforylové skupiny z *A/GcHK* na aspartátový zbytek 52 v Rec1 doméně RR. Druhým místem fosforylace je i aspartátový zbytek 169 v Rec2 doméně RR. Pravděpodobně nejčastěji dochází nejprve k fosfotransferu na D52 a poté k fosfotransferu na D169, čímž vzniká difosforylovaná forma RR (dle dříve provedených experimentů^{2,83}), avšak na záznamu Phos-tag elektroforézy, jenž je součástí této práce, nebyla difosforylovaná forma z metodologických důvodů pozorovatelná (shodná mobilita s jiným proteinem v systému).
- Bylo provedeno teoretické modelování struktury komplexu *A/GcHK*:RR pomocí programu AlphaFold3. Výsledný teoretický model nedosahuje jako celek příliš velké přesnosti kvůli flexibilním oblastem proteinů, ačkoliv samotné struktury jednotlivých domén byly určeny s vyšší přesností. Vytvořený model koresponduje se zjištěním, že k interakci proteinů v komplexu dochází prostřednictvím $\alpha 8$ a $\alpha 9$ helixu dimerizační domény *A/GcHK* a $\alpha 1$ helixu a $\alpha 5$ - $\beta 5$ smyčky RR⁶⁵. Také bylo zjištěno, že vzájemná poloha dimerizačních a katalytických domén v tomto modelu je předpokladem pro uskutečnění autofosforylační reakce trans mechanismem, což koresponduje s nedávno provedenou studií⁸⁰.
- Pomocí kryoelektronové mikroskopie byl vytvořen experimentální model komplexu *A/GcHK*:RR. Model dosahuje nízkého rozlišení a jeho celková kvalita není příliš uspokojivá. V porovnání s teoretickým modelem z AlphaFoldu3 dochází k překryvu modelů v oblasti kinázové domény a části sensorové domény histidinkinázy *A/GcHK* a v části oblasti Rec1

domény RR. Mechanismus fosfotransferázové reakce v komplexu *A*GcHK:RR se nepodařilo na základě experimentálního modelu lépe objasnit.

- Bohužel se nepodařilo naplnit poslední, pátý cíl diplomové práce, a to určit strukturu homodimeru *A*GcHK-MBP tag pomocí kryoelektronové mikroskopie.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Gao, R. & Stock, A. M. Biological insights from structures of two-component proteins. *Annual Review of Microbiology* 63, 133-154 (2009).
2. 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*. *Journal of Biological Chemistry* 286, 35522-35534 (2011).
3. Mizuno, T. Compilation of All Genes Encoding Two-Component Phosphotransfer Signal Transducers in the Genome of Escherichia Coli. *DNA Res* 4, 161-168 (1997).
4. Wadhams, G. H. & Armitage, J. P. Making sense of it all: Bacterial chemotaxis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 1024-1037 (2004).
5. Maeda, T., Wurgler-Murphy, S. & Saito, H. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 369, 242-245 (1994).
6. Wilkinson, J. Q., Lanahan, M. B., Yen, H. C., Giovannoni, J. J. & Klee, H. J. An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by never-ripe. *Science* 270, 1807-1809 (1995).
7. Albanesi, D., Martín, M., Trajtenberg, F., Mansilla, M. C., Haouz, A., Alzari, P. M., De Mendoza, D. & Buschiazzo, A. Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 16185-16190 (2009).
8. Möglich, A., Ayers, R. A. & Moffat, K. Design and signaling mechanism of light-regulated histidine kinases. *J Mol Biol* 385, 1433-1444 (2009).
9. Unden, G., Nilkens, S. & Singenstreu, M. Bacterial sensor kinases using Fe-S cluster binding PAS or GAF domains for O₂ sensing. *Dalton Trans* 42, 3082-3087 (2013).
10. Sevvana, M. *et al.* A ligand-induced switch in the periplasmic domain of sensor histidine kinase CitA. *J Mol Biol* 377, 512-523 (2008).
11. Stock, A. M., Robinson, V. L. & Goudreau, P. N. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 69, 183-2015 (2000).
12. Römling, U., Gomelsky, M. & Galperin, M. Y. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol Microbiol* 57, 629-639 (2005).

13. Djordjevic, S., Goudreau, P. N., Xu, Q., Stock, A. M. & West, A. H. Structural basis for methylesterase CheB regulation by a phosphorylation-activated domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 1381–1386 (1998).
14. Martínez-Hackert, E. & Stock, A. M. Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. *J Mol Biol* 269, 301–312 (1997).
15. Dutta, R. & Inouye, M. Reverse phosphotransfer from OmpR to EnvZ in a kinase-/phosphatase+ mutant of EnvZ (EnvZ·N_{347D}), a bifunctional signal transducer of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 271, 1424–1429 (1996).
16. Gao, R. & Stock, A. M. Quantitative Kinetic Analyses of Shutting Off a Two-Component System. *mBio* 8, 412–17 (2017).
17. Krell, T., Lacal, J., Busch, A., Silva-Jiménez, H., Guazzaroni, M. E. & Ramos, J. L. Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals. *Annu Rev Microbiol* 64, 539–559 (2010).
18. Parkinson, J. S., Hazelbauer, G. L. & Falke, J. J. Signaling and sensory adaptation in *Escherichia coli* chemoreceptors: 2015 update. *Trends Microbiol* 23, 257–266 (2015).
19. Adebali, O., Petukh, M. G., Reznik, A. O., Tishkov, A. V., Upadhyay, A. A. & Zhulin, I. B. Class III Histidine Kinases: a Recently Accessorized Kinase Domain in Putative Modulators of Type IV Pilus-Based Motility. *J Bacteriol* 199, 218–17 (2017).
20. Zhang, Z., Liu, Q. & Hendrickson, W. A. Crystal structures of apparent saccharide sensors from histidine kinase receptors prevalent in a human gut symbiont. *FEBS J* 281, 4263–4279 (2014).
21. Dupré, E. *et al.* Virulence regulation with Venus flytrap domains: structure and function of the periplasmic moiety of the sensor-kinase BvgS. *PLoS Pathog* 11, 1–21 (2015).
22. Wang, L., Quan, C., Xiong, W., Qu, X., Fan, S. & Hu, W. New insight into transmembrane topology of *Staphylococcus aureus* histidine kinase AgrC. *Biochim Biophys Acta* 1838, 988–993 (2014).
23. Gushchin, I., Orekhov, P., Melnikov, I., Polovinkin, V., Yuzhakova, A. & Gordeliy, V. Sensor Histidine Kinase NarQ Activates via Helical Rotation, Diagonal Scissoring, and Eventually Piston-Like Shifts. *Int J Mol Sci* 21, (2020).

24. Alex, L. A. & Simon, M. I. Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *Trends in Genetics* 10, 133–138 (1994).
25. Khorchid, A., Inouye, M. & Ikura, M. Structural characterization of *Escherichia coli* sensor histidine kinase EnvZ: the periplasmic C-terminal core domain is critical for homodimerization. *Biochem J* 385, 255–264 (2005).
26. Dutta, R. & Inouye, M. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem Sci* 25, 24–28 (2000).
27. Bilwes, A. M., Alex, L. A., Crane, B. R. & Simon, M. I. Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell* 96, 131–141 (1999).
28. Bilwes, A. M., Quezada, C. M., Croal, L. R., Crane, B. R. & Simon, M. I. Nucleotide binding by the histidine kinase CheA. *Nat Struct Biol* 8, 353–360 (2001).
29. Wu, R., Gu, M., Wilton, R., Babnigg, G., Kim, Y., Pokkuluri, P. R., Szurmant, H., Joachimiak, A. & Schiffer, M. Insight into the sporulation phosphorelay: crystal structure of the sensor domain of *Bacillus subtilis* histidine kinase, KinD. *Protein Sci* 22, 564–576 (2013).
30. Cheung, J. & Hendrickson, W. A. Structural analysis of ligand stimulation of the histidine kinase NarX. *Structure* 17, 190–201 (2009).
31. Key, J., Šrajcar, V., Pahl, R. & Moffat, K. Time-resolved crystallographic studies of the heme domain of the oxygen sensor FixL: structural dynamics of ligand rebinding and their relation to signal transduction. *Biochemistry* 46, 4706–4715 (2007).
32. Szurmant, H., White, R. A. & Hoch, J. A. Sensor complexes regulating two-component signal transduction. *Curr Opin Struct Biol* 17, 706–715 (2007).
33. Möglich, A., Ayers, R. A. & Moffat, K. Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Structure* 17, 1282–1294 (2009).
34. Müllner, M., Hammel, O., Mienert, B., Schlag, S., Bill, E. & Udden, G. A PAS domain with an oxygen labile [4Fe-4S](2+) cluster in the oxygen sensor kinase NreB of *Staphylococcus carnosus*. *Biochemistry* 47, 13921–13932 (2008).
35. Ho, Y. S. J., 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* 19, 5288–5299 (2000).

36. Cho, H. Y., Cho, H. J., Kim, Y. M., Oh, J. Il & Kang, B. S. Structural insight into the heme-based redox sensing by DosS from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 284, 13057–13067 (2009).
37. Podust, L. M., Ioanoviciu, A. & Ortiz De Montellano, P. R. 2.3 A X-ray structure of the heme-bound GAF domain of sensory histidine kinase DosT of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 47, 12523–12531 (2008).
38. Cheung, J., Bingman, C. A., Reyngold, M., Hendrickson, W. A. & Waldburger, C. D. Crystal structure of a functional dimer of the PhoQ sensor domain. *J Biol Chem* 283, 13762–13770 (2008).
39. Shah, N., Gaupp, R., Moriyama, H., Eskridge, K. M., Moriyama, E. N. & Somerville, G. A. Reductive evolution and the loss of PDC/PAS domains from the genus *Staphylococcus*. *BMC Genomics* 14, (2013).
40. Pappalardo, L., Janausch, I. G., Vijayan, V., Zientz, E., Junker, J., Peti, W., Zweckstetter, M., Unden, G. & Griesinger, C. The NMR structure of the sensory domain of the membranous two-component fumarate sensor (histidine protein kinase) DcuS of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 278, 39185–39188 (2003).
41. Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczar, I., Bassler, B. L. & Hughson, F. M. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 415, 545–549 (2002).
42. Cheung, J. & Hendrickson, W. A. Structural analysis of ligand stimulation of the histidine kinase NarX. *Structure* 17, 190–201 (2009).
43. Gao, R., Bouillet, S. & Stock, A. M. Structural Basis of Response Regulator Function. *Annu Rev Microbiol* 73, 175–197 (2025).
44. Paysan-Lafosse, T. *et al.* The Pfam protein families database: embracing AI/ML. *Nucleic Acids Res* 53, 523–534 (2025).
45. Szurmant, H. & Ordal, G. W. Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 301–319 (2004).
46. Lowe, E. C., Baslé, A., Czjzek, M., Firbank, S. J. & Bolam, D. N. A scissor blade-like closing mechanism implicated in transmembrane signaling in a *Bacteroides* hybrid two-component system. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 7298–7303 (2012).

47. Zschiedrich, C. P., Keidel, V. & Szurmant, H. Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction. *Journal of Molecular Biology* 428, 3752–3775 (2016).
48. Bhate, M. A. P., Molnar, K. A. S., Goulian, M. & Degrado, W. F. Signal Transduction in Histidine Kinases: Insights from New Structures. *Structure* 23, 981–994 (2015).
49. Falke, J. J. & Erbse, A. H. The piston rises again. *Structure* 17, 1149–1151 (2009).
50. Molnar, K. S., Bonomi, M., Pellarin, R., Clinthorne, G. D., Gonzalez, G., Goldberg, S. D., Goulian, M., Sali, A. & Degrado, W. F. Cys-scanning disulfide crosslinking and bayesian modeling probe the transmembrane signaling mechanism of the histidine kinase, PhoQ. *Structure* 22, 1239–1251 (2014).
51. Neiditch, M. B., Federle, M. J., Pompeani, A. J., Kelly, R. C., Swem, D. L., Jeffrey, P. D., Bassler, B. L. & Hughson, F. M. Ligand-induced asymmetry in histidine sensor kinase complex regulates quorum sensing. *Cell* 126, 1095–1108 (2006).
52. Glekas, G. D., Foster, R. M., Cates, J. R., Estrella, J. A., Wawrzyniak, M. J., Rao, C. V. & Ordal, G. W. A PAS domain binds asparagine in the chemotaxis receptor McpB in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 285, 1870–1878 (2010).
53. Hulko, M. *et al.* The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. *Cell* 126, 929–940 (2006).
54. Korycinski, M., Albrecht, R., Ursinus, A., Hartmann, M. D., Coles, M., Martin, J., Dunin-Horkawicz, S. & Lupas, A. N. STAC--A New Domain Associated with Transmembrane Solute Transport and Two-Component Signal Transduction Systems. *J Mol Biol* 427, 3327–3339 (2015).
55. Koretke, K. K., Lupas, A. N., Warren, P. V, Rosenberg, M. & Brown, J. R. Evolution of Two-Component Signal Transduction. *Mol. Biol. Evol* 17, 1956–1970 (2000).
56. Tomomori, C. *et al.* Solution structure of the homodimeric core domain of *Escherichia coli* histidine kinase EnvZ. *Nat Struct Biol* 6, 729–734 (1999).
57. Ninfa, E. G., Atkinson, M. R., Kamberov, E. S. & Ninfa, A. J. Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NRII or NtrB): trans-phosphorylation between subunits. *J Bacteriol* 175, 7024–7032 (1993).
58. Swanson, R. V., Bourret, R. B. & Simon, M. I. Intermolecular complementation of the kinase activity of CheA. *Mol Microbiol* 8, 435–441 (1993).

59. Casino, P., Rubio, V. & Marina, A. Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell*139, 325–336 (2009).
60. Peña-Sandoval, G. R. & Georgellis, D. The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli* autophosphorylates by an intramolecular reaction. *J Bacteriol*192, 1735–1739 (2010).
61. Marina, A., Waldburger, C. D. & Hendrickson, W. A. Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine-kinase protein. *EMBO J*24, 4247–4259 (2005).
62. Casino, P., Rubio, V. & Marina, A. Structural Insight into Partner Specificity and Phosphoryl Transfer in Two-Component Signal Transduction. *Cell*139, 325–336 (2009).
63. Zapf, J., Sen, U., Madhusudan, Hoch, J. A. & Varughese, K. I. A transient interaction between two phosphorelay proteins trapped in a crystal lattice reveals the mechanism of molecular recognition and phosphotransfer in signal transduction. *Structure* 8, 851–862 (2000).
64. Tzeng, Y. L. & Hoch, J. A. Molecular recognition in signal transduction: the interaction surfaces of the Spo0F response regulator with its cognate phosphorelay proteins revealed by alanine scanning mutagenesis. *J Mol Biol*272, 200–212 (1997).
65. Stranova, M., Martínek, V., Man, P., Fojtikova, V., Kavan, D., Vaněk, O., Shimizu, T. & Martinkova, 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* 84, 1375–1389 (2016).
66. Stranova M, Man P, Skálová T, Kolenko P, Blaha J, Fojtikova 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* 292, 20921–20935 (2017).
67. Fojtikova, V., Stranova, M., Vos, M. H., Liebl, U., Hranicek, J., Kitanishi, K., Shimizu, T. & Martinkova, M. Kinetic Analysis of a Globin-Coupled Histidine Kinase, AfGcHK: Effects of the Heme Iron Complex, Response Regulator, and Metal Cations on Autophosphorylation Activity. *Biochemistry*54, 5017–5029 (2015).
68. Fojtikova, V., Bartosova, M., Man, P., Stranova, M., Shimizu, T. & Martinkova, M. Effects of hydrogen sulfide on the heme coordination structure and catalytic activity of the globin-coupled oxygen sensor AfGcHK. *BioMetals* 29, 715–729 (2016).

69. Kitanishi, K., Shimonaka, M. & Unno, M. Characterization of a Cobalt-Substituted Globin-Coupled Oxygen Sensor Histidine Kinase from *Anaeromyxobacter sp. Fw109-5*: Insights into Catalytic Regulation by Its Heme Coordination Structure. *ACS Omega* 6, 34912–34919 (2021).
70. Skalova T, Lengalova A, Dohnalek J, Harlos K, Mihalcin P, Kolenko P, Stranova M, Blaha J, Shimizu T, Martínková M. Disruption of the dimerization interface of the sensing domain in the dimeric heme-based oxygen sensor AfGcHK abolishes bacterial signal transduction. *Journal of Biological Chemistry* 295, 1587–1597 (2020).
71. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. & Bairoch, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook* 571–607 (2005).
72. The UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Res* 53, 609–617 (2025).
73. Abramson, J. *et al.* Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature* 630, 493–500 (2024).
74. Booth, D. S., Avila-Sakar, A. & Cheng, Y. Visualizing proteins and macromolecular complexes by negative stain EM: from grid preparation to image acquisition. *J Vis Exp* 58, (2011)
75. Chen, S., McMullan, G., Faruqi, A. R., Murshudov, G. N., Short, J. M., Scheres, S. H. W. & Henderson, R. High-resolution noise substitution to measure overfitting and validate resolution in 3D structure determination by single particle electron cryomicroscopy. *Ultramicroscopy* 135, 24–35 (2013).
76. Tierney, A. R. P. & Rather, P. N. Roles of two-component regulatory systems in antibiotic resistance. *Future Microbiology* 14, 533–552 (2019).
77. Lingzhi, L., Haojie, G., Dan, G., Hongmei, M., Yang, L., Mengdie, J., Chengkun, Z. & Xiaohui, Z. The role of two-component regulatory system in β -lactam antibiotics resistance. *Microbiological Research* 215, 126–129 (2018).
78. Mihalčín, P. Štúdium mechanizmu prenosu signálu v prípade dvoch modelových zástupcov hemových senzorových proteínov. Diplomová práca, Praha: Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie. (2019).

79. Fojtíková, V. Důležité role hemu: signál pro hem-detekující proteiny a detekční místo v plyn-detekujících proteinech. Bakalářská práce, Praha: Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie. (2012).
80. Smrčka, T. Mechanismus přenosu signálu v modelovém zástupci prokaryotních hemových sensorů kyslíku. Diplomová práce, Praha: Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie. (2023).
81. Bečková, A. Dvousložkový signalizační systém bakterií využívající analogy hemu. Bakalářská práce, Praha: Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie. (2023).
82. Hlubučková, D. Biochemická charakterizace modelového zástupce hemových sensorových proteinů obsahujícího analog hemu. Bakalářská práce, Praha: Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie (2023).
83. Vávra, J., Sergunin, A., Shimizu, T. & Martínková, M. Monitoring the Kinase Activity of Heme-Based Oxygen Sensors and Its Dependence on O₂ and Other Ligands Using Phos-Tag Electrophoresis. in *Methods in Molecular Biology* 2648, 63–73 (2023).
84. Veronika Fojtíková, B. Určení kinetických parametrů pro enzymovou reakci katalyzovanou histidinkinasou s globinovou strukturou sensorové domény. Diplomová práce, Praha: Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie. (2014).
86. Kirchdoerfer, R. N. & Ward, A. B. Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors. *Nat Commun* 10, 1–9 (2019).
87. Hofmann, S. *et al.* Conformation space of a heterodimeric ABC exporter under turnover conditions. *Nature* 571, 580–583 (2019).
88. Safarian, S. *et al.* Active site rearrangement and structural divergence in prokaryotic respiratory oxidases. *Science (1979)* 366, 100–104 (2019).
89. Herzik, M. A., Wu, M. & Lander, G. C. High-resolution structure determination of sub-100 kDa complexes using conventional cryo-EM. *Nat Commun* 10, 1–9 (2019).
90. Han, Y., Fan, X., Wang, H., Zhao, F., Tully, C. G., Kong, J., Yao, N. & Yan, N. High-yield monolayer graphene grids for near-atomic resolution cryoelectron microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 117, 1009–1014 (2020).

91. Zhang, K., Li, S., Kappel, K., Pintilie, G., Su, Z., Mou, T.-C., Schmid, M. F., Das, R. & Chiu, W. Cryo-EM structure of a 40 kDa SAM-IV riboswitch RNA at 3.7 Å resolution. *Nat Commun* 10, (2019).
92. Schwartz, O., Axelrod, J. J., Campbell, S. L., Turnbaugh, C., Glaeser, R. M. & Müller, H. Laser phase plate for transmission electron microscopy. *Nat Methods* 16, 1016–1020 (2019).
93. Danev, R., Buijsse, B., Khoshouei, M., Plitzko, J. M. & Baumeister, W. Volta potential phase plate for in-focus phase contrast transmission electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 15635–15640 (2014).
94. Kim, L. Y. *et al.* Benchmarking cryo-EM Single Particle Analysis Workflow. *Front Mol Biosci* 5, (2018).
95. Wu, S. *et al.* Fabs enable single particle cryoEM studies of small proteins. *Structure* 20, 582–592 (2012).
96. Uchański, T. *et al.* Megabodies expand the nanobody toolkit for protein structure determination by single-particle cryo-EM. *Nat Methods* 18, 60–68 (2021).
97. Liu, Y., Gonen, S., Gonen, T. & Yeates, T. O. Near-atomic cryo-EM imaging of a small protein displayed on a designed scaffolding system. *Proc Natl Acad Sci USA* 115, 3362–3367 (2018).
98. Straube, R. Reciprocal Regulation as a Source of Ultrasensitivity in Two-Component Systems with a Bifunctional Sensor Kinase. *PLoS Comput Biol* 10, (2014).