Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Biofyzikální chemie

Bc. Jakub Vávra

Porovnání vlastností transkripčního faktoru "Bach1" v jeho apoformě a holoformě
Comparison of apoform and holoform of the transcription factor "Bach1"

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: doc. RNDr. Markéta Martínková, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyly předloženy k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 2.5. 2019

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat především své školitelce doc. RNDr. Markétě Martínkové, Ph.D. za profesionální vedení mé diplomové práce, cenné rady a připomínky a také za podporu v průběhu mého dosavadního studia. Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Alžbětě Lengálové za velkou trpělivost, skvělý pedagogický přístup a vytvoření přátelské a kolegiální atmosféry v laboratoři číslo 217 a Mgr. Martinu Stráňavovi, Ph.D. za ochotu a cenné náměty při plánování AUC experimentů. Mé poděkování patří také doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi, Ph.D. za pomoc při provedení AUC experimentů a zpracování jejich výsledků, RNDr. Olívii Petrvalské, Ph.D. za cenné rady při zpracování a interpretaci výsledků AUC experimentů a RNDr. Jakubu Hraníčkovi, Ph.D. za provedení AAS měření. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat mé rodině a přítelkyni, bez jejichž podpory by tato diplomová práce nemohla vzniknout.

Abstrakt

Hemoproteiny představují vzhledem k jejich širokému výskytu a rozmanitým funkcím nepostradatelnou součást mnoha živých organismů. Mezi typické funkce hemoproteinů patří participace na transportu a uskladnění kyslíku v živých organismech, transport elektronů v rámci dýchacího řetězce či enzymová katalýza reakcí, kterých se účastní kyslík, případně peroxid vodíku. Poměrně nedávno byla objevena nová skupina hemoproteinů, jejíž zástupci disponují schopností detekovat buď změny koncentrace hemu (senzorové proteiny, které detekují hem), nebo změny koncentrace dvouatomových molekul plynů (hemové senzorové proteiny, které detekují plyny) v jejich okolním prostředí. Signály generované v rámci této detekce způsobují strukturní změny příslušných senzorových proteinů a ovlivňují tak jejich funkce.

Předmětem této diplomové práce je příprava a následná charakterizace eukaryotického senzorového proteinu Bach1, který detekuje hem. Důraz je kladen především na interakční schopnosti proteinu Bach1 s heminem a komparaci vlastností apoformy a holoformy Bach1. Pozornost je věnována hlavně počtu molekul heminu, které jsou schopny specificky interagovat s Bach1, a to za různých podmínek (odlišný redoxní stav iontu železa v hemu, přítomnost interakčních partnerů Bach1 apod.). Součástí této práce je také analýza vlivu heminu, který specificky interaguje s Bach1, na oligomerní stav tohoto proteinu a na jeho strukturní vlastnosti.

Klíčová slova: hemové proteiny, senzorové proteiny detekující hem, Bach1, transkripční faktory, transdukce signálu

Abstract

Hemoproteins represent very important components of many living organisms. Participation in the processes of oxygen transport and storage, electron transport or enzymatic catalysis of reactions involving oxygen or hydrogen peroxide are commonly known functions of hemoproteins. Recently, there has been discovered a new group of hemoproteins. The main feature of this new group of proteins is their ability to detect changes in heme concentration (heme-responsive proteins) or changes in diatomic gas concentration (gas-responsive heme-containing sensor proteins) in their vicinity. Detection of these concentration changes generates signals that induce structural changes of the respective sensor proteins. Finally, the structural changes of the respective sensor proteins affect their functions or activities.

The subject of this diploma thesis is the preparation and characterization of the eukaryotic heme sensor Bach1. We especially focused on the ability of Bach1 to bind heme molecules and on the comparison of various Bach1 properties in its apoform and holoform. Determination of the exact amount of heme molecules that specifically interact with heme sensor Bach1 represents very important part of this thesis. We also studied the effect of different redox states of heme iron and the presence of interaction partners of Bach1 on its heme binding ability. The effect of heme binding on the oligomeric state and the structural properties of Bach1 is also described in this thesis.

Key words: hemoproteins, heme-responsive proteins, Bach1, transcription factors, signal transduction

Obsah

Abstrakt 3

Abstract 4

1 Použité zkratky 8

2 Teoretický úvod 14

2.1 Vlastnosti a rozdělení hemových proteinů 14

2.2 Hemové senzorové proteiny 18

2.3 Hemové senzorové proteiny detekující plynné molekuly 19

2.3.1 Hemové senzorové proteiny detekující kyslík 20

2.3.2 Hemové senzorové proteiny detekující oxid dusnatý 22

2.3.3 Hemové senzorové proteiny detekující oxid uhelnatý 22

2.3.4 Vliv sulfanu a polysulfidů na hemové senzorové proteiny 23

2.4 Senzorové proteiny detekující hem 24

2.4.1 Inhibitor proteosyntézy regulovaný hemem (HRI) 26

2.4.2 Bach1 27

2.5 Spektrofotometrická detekce molekul hemu, respektive iontu železa 31

2.5.1 Absorpce viditelného záření molekulou hemu 31

2.5.2 Detekce volných molekul hemu využívající pyridin 32

2.5.3 Atomová absorpční spektrometrie 32

2.6 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie 33

2.7 Metody molekulární biologie 34

2.7.1 Plasmid pET-21c(+) 34

2.7.2 Plasmidy pTW5 a pTW5Sec 35

2.8 Analytická ultracentrifugace 37

3 Cíle diplomové práce 39

4 Materiál a metody 40

4.1 Použité přístroje a zařízení 40

4.2 Použité chemikálie a materiál 41
4.3 Metody molekulární biologie 44
4.3.1 Transformace buněk *E. coli* DH5α a *E. coli* BL-21(DE3) 44
4.3.2 Izolace plasmidové DNA 45
4.3.3 Příprava plasmidů pTW5/Bach1-Histag a pTW5sec/Bach1-Histag 46
4.3.4 Sekvenace genu pro Bach1 vloženého ve vektorech pTW5/Bach1-Histag a pTW5Sec/Bach1-Histag 48
4.3.5 Příprava DNA obsahující MARE úseky 48
4.3.6 Prokaryotická exprese proteinu Bach1 49
4.3.7 Izolace apoformy a holoformy proteinu Bach1 z buněk *E. coli* BL-21(DE3) 50
4.3.8 Optimalizace prokaryotické exprese proteinu Bach1 52
4.4 Elektroforetické metody 53
4.4.1 Horizontální agarosová elektroforéza 53
4.4.2 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS-PAGE) 54
4.5 Spektrofotometrické metody 56
4.5.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace plasmidové DNA a proteinu v roztoku 56
4.5.2 Stanovení celkového obsahu molekul hemu v roztoku 57
4.5.3 Spektrofotometrická titrace Bach1, MafK-MBP a DNA obsahující MARE úseky heminem 57
4.5.4 Reverzní titrace roztoku heminu apoformou Bach1 59
4.5.5 Vliv jiných redoxních a ligandových stavů hemu na koordinační vlastnosti Bach1 60
4.5.6 Atomová absorpční spektrometrie (AAS) 60
4.6 Chromatografické metody 61
4.6.1 Stanovení katalytické aktivity proteinu YddV-MBP WT a jeho mutantu Y43A v přítomnosti sulfidu sodného pomocí HPLC 61

4.7 Analytická ultracentrifugace proteinu Bach1 62
5 Výsledky 64
5.1 Příprava plasmidů pTW5/Bach1-Histag a pTW5Sec/Bach1-Histag 64
5.2 Příprava DNA obsahující MARE úseky 66
5.3 Prokaryotická exprese proteinů Bach1 66
5.4 Izolace proteinu Bach1 v jeho apoformě a holoformě 67
5.5 Optimalizace prokaryotické exprese proteinu Bach1 69
5.6 Celkový obsah molekul hemu v preparátu holoformy Bach1 71
5.7 Spektrofotometrická titrace roztoku izolovaných makromolekul Bach1, MafK-MBP a DNA obsahující MARE úseky heminem 71
5.8 Spektrofotometrická titrace roztoků vzájemných směsí makromolekul Bach1, MafK-MBP a DNA obsahující MARE úseky heminem 76
5.9 Reverzní spektrofotometrická titrace roztoku heminu apoformou Bach1 79
5.10 Vliv jiných redoxních a ligandových stavů iontu železa v hemu na koordinační vlastnosti Bach1 81
5.11 Stanovení celkové koncentrace iontů železa v preparátech proteinu Bach1 pomocí AAS 83
5.12 Analytická ultracentrifugace proteinu Bach1 84
YddV-MBP 85
5.13 Stanovení katalytické aktivity proteinu YddV-MBP WT a jeho mutantu Y43A v přítomnosti sulfidu sodného pomocí HPLC 85
6 Diskuze 89
7 Závěr 96
8 Seznam použitých zdrojů 97

1 Použité zkratky

A_{260}	absorbance při 260 nm
ΔA	rozdíl hodnot absorbancí při 557 nm a při 541 nm
AAS	atomová absorpční spektrometrie
*Af*GcHK	histidinkinasa s globinovou strukturou senzorové domény z bakterie *Anaeromyxobacter sp.*
ALA-synthasa	synthasa δ-aminolevulové kyseliny
AU	z angl. „arbitrary units“, relativní jednotka absorbance
AUC	analytická ultracentrifugace
Bach1	senzorový protein, který detekuje hem, pojmenování vychází z názvu významné domény tohoto proteinu (BTB doména) a názvu rodiny transkripčních faktorů, do které tento protein patří (CNC), tedy **B**TB **a** **C**NC **h**omolog **1**
BCA	bicinchoninová kyselina
BIS	N,N´-methylen-bis-akrylamid
bp	páry bází
BSA	hovězí sérový albumin
BTB doména	jedna z významných domén proteinu Bach1, z anglického pojmenování „**B**road complex – **T**ramtrack – **B**rick – a – brack domain“
c	koncentrace plasmidové DNA v roztoku
c_{hem}	koncentrace hemu v roztoku
c-di-GMP	cyklický diguanosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát

CNC rodina	název rodiny transkripčních faktorů, z anglického pojmenování „**C**ap'**n**'**C**ollar" rodina
CooA doména	doména senzoru oxidu uhelnatého CooA umožňující detekci molekul oxidu uhelnatého, CooA pochází z anglického názvu „**CO**-**O**xidation **A**ctivator protein"
CP motiv	motiv vyskytující se v polypeptidovém řetězci složený ze sekvence aminokyselin cysteinu a prolinu
D	difuzní koeficient
Da	Dalton
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
$\Delta\varepsilon$	rozdíl hodnot molárních absorpčních koeficientů při 557 nm a při 541 nm
*Ec*DOS	hemový senzorový protein, který detekuje kyslík, z anglického „***E**scherichia **c**oli* **d**irect **o**xygen **s**ensor"
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
eIF2α	**e**ukaryotický **i**niciační **f**aktor **2α**
f	třecí (frikční) koeficient částice
g	tíhové zrychlení
GAF	strukturní motiv prostorového uspořádání proteinů, akronym odvozený z anglických názvů proteinů, ve kterých se tento strukturní motiv objevuje: „c**G**MP specific phospodiesterases", „**a**denyl cyclases" a „*E. coli* **f**ormate hydrogenlyase transcriptional activator"

G-kvadruplex	útvar vznikající v oblasti DNA obsahující velký počet deoxyguanosinových nukleotidů, je tvořen rovinami G-kvartetů
G-kvartet	rovinný útvar tvořený čtyřmi guaninovými bázemi, které jsou vzájemně propojeny prostřednictvím vodíkových můstků
GTP	guanosintrifosfát
H-NOX doména	doména hemových senzorových proteinů, které detekují oxid dusnatý; tato doména umožňuje vazbu oxidu dusnatého na navázanou molekulu hemu, z anglického názvu „**h**eme-**n**itric **ox**ide binding domain“
HO	hemoxygenasa
HOIL-1	ligasa umožňující degradaci proteinu Bach1 s navázaným hemem, název pochází z anglického „**h**eme-**o**xidized **I**RP2 ubiquitin **l**igase-**1**“, kde IRP2 pochází z anglického „**i**ron **r**egulátory **p**rotein **2**“
HRI	inhibitor proteosyntézy regulovaný hemem
HS^-	hydrogensulfidový ion
IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid
k_{cat}	katalytická konstanta enzymové reakce
K_M	Michaelisova konstanta
l	tloušťka absorpčního prostředí
LB agar	Luria Broth agar
LB médium	Luria Broth médium
M	molární hmotnost

Maf proteiny	svalovoaponeurotické fibrosarkomové proteiny, z anglického „**m**usculo**a**ponеurotic **f**ibrosarcoma proteins“
MafK	svalovoaponeurotický fibrosarkomový protein typu K
MafK-MBP	protein MafK s MBP vázaným na jeho N-konci
MARE	sekvence DNA tvořící **Ma**f **r**ozpoznávací **e**lement
MBP	motiv přidávaný na N-konec případně C-konec rekombinantních proteinů umožňující purifikaci příslušných proteinů z komplexních směsí a zvyšující stabilitu izolovaných proteinů, zkratka vychází z anglického názvu „**m**altose **b**inding **p**rotein“
MPa	megapascal
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
PAS	strukturní motiv prostorového uspořádání proteinů, akronym odvozený z anglických názvů tří proteinů, ve kterých se tento strukturní motiv vyskytuje: „*Drosophila* **p**eriod clock protein“, „vertebrate **a**ryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ a „*Drosophila* **s**ingle minded protein“
PCR	polymerasová řetězová reakce
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
p53	protein kódovaný tumor supresorovým genem *TP53*
r	vzdálenost sedimentující částice od středu otáčení
R	univerzální plynová konstanta
$R_{max-min}$	rozpětí souboru výsledků, tedy rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou v tomto souboru

RPM	počet otáček za minutu
s	odchylka souboru výsledků
S	sedimentační koeficient
S	Svedberg
SDS	dodecylsíran sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
sGC	**s**olubilní **g**uanylát**c**yklasa
sukcinyl-CoA	sukcinylkoenzym A
$S_{20,w}$	sedimentační koeficient korigovaný na teplotu 20 °C a vodu jako rozpouštědlo
T	absolutní teplota
TAE pufr	pufr obsahující Tris-acetát a EDTA (viz kapitola 4.4.1.)
TB médium	vodný roztok obsahující 12 $g.l^{-1}$ Bacto Yeast Extract; 24 $g.l^{-1}$ Bacto Tryptone; 0,017 $mol.l^{-1}$ dihydrogefosforečnanu draselného; 0,072 $mol.l^{-1}$ hydrogenfosforečnanu draselného a 0,04% (*v/v*) glycerolu
TEMED	N,N,N´,N´-tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV-VIS spektrofotometrie	spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti
v	rychlost sedimentace částice
$\bar{v}$	parciální specifický objem sedimentující částice
V_{max}	maximální rychlost enzymové reakce

v/v	objemová procenta
ω	úhlová rychlost
WT	přirozeně se vyskytující forma proteinu, z anglického „**w**ild **t**ype“
w/v	hmotnostně-objemová procenta
x	medián souboru výsledků
YddV	diguanylátcyklasa s globinovou strukturou senzorové domény, zkratka YddV vychází z označení genu pro tento protein (*yddv*), funkce tohoto genu nebyla v době objevení známa
ρ	hustota rozpouštědla

2 Teoretický úvod

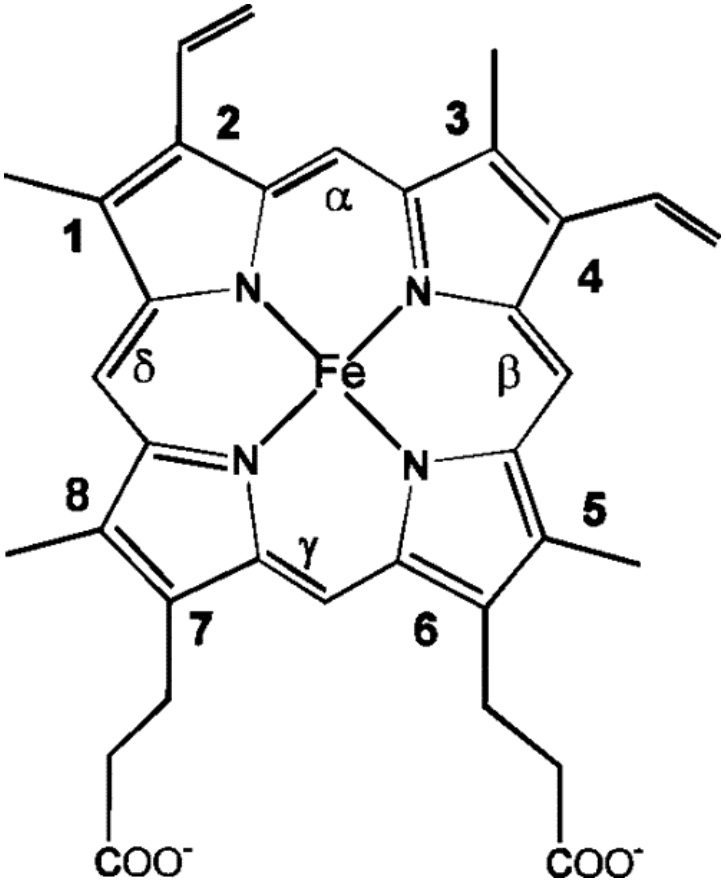
2.1 Vlastnosti a rozdělení hemových proteinů

Hemové proteiny (zkráceně hemoproteiny) tvoří významnou a mezi živými organismy široce rozšířenou skupinu tzv. metaloproteinů [1]. Metaloproteiny, které představují přibližně polovinu všech na Zemi se vyskytujících proteinů, obsahují ve své struktuře ionty kovů (např. železa, mědi, zinku, manganu, hořčíku apod.) umožňující těmto proteinům zaujmout požadovanou strukturu a vykonávat jejich fyziologické funkce [2]. Jedná se především o katalýzu biochemických reakcí v živých organismech, ale také přenos elektronů a molekul či buněčnou signalizaci [2,3]. Ionty kovů katalyzují některé procesy mnohem účinněji než samotné proteinové struktury. Byly popsány také proteiny mající funkci senzorů koncentrace kovových iontů v okolním prostředím. Taková detekce je pro organismus velmi důležitá, především z důvodu možné tvorby reaktivních forem kyslíku v důsledku přítomnosti volných iontů kovů v intracelulárním prostředí [2]. Regulace přítomnosti volných iontů kovů představuje také důležitou součást obrany organismu před potenciálními patogeny. Mnoho patogenních organismů využívá jako zdroj iontů kovů potřebných pro své vlastní fyziologické funkce právě hostitele [4]. Významný je v tomto směru především ion železa, pro který řada patogenů vyvinula velmi specifické transportní mechanismy (např. siderofory disponující vysokou afinitou k iontu železa, s nímž tvoří cheláty) [5]. Potenciální hostitelé se před těmito parazity brání využitím velmi sofistikovaného systému. Ten je schopen regulovat koncentraci volných iontů kovů, tak aby pokryla veškerou vlastní fyziologickou potřebu, ale zároveň koncentrace volných iontů kovů nesmí představovat pro hostitele riziko z hlediska tvorby reaktivních forem kyslíku a volné ionty kovů nesmí být k dispozici potenciálním parazitům (tím se potenciální hostitelé brání před infekcí potenciálními parazity) [4].

Železo patří mezi stopové prvky esenciální pro většinu živých organismů včetně člověka [6]. Vzhledem k toxicitě volných iontů železa a jejich nízké rozpustnosti v neutrálním vodném prostředí bylo nezbytné, aby organismy v průběhu evoluce vyvinuly mechanismy schopné zajistit optimální distribuci tohoto prvku [7]. Klíčovou roli v tomto procesu představují proteiny schopné vázat ionty železa. Některé proteiny jsou schopny přímé vazby iontů železa, nicméně častěji vytváří proteiny vazby s ionty železa ve formě FeS klastrů či hemu [6]. Proteiny využívající pro vazbu iontů železa FeS klastry představují evolučně starší skupinu v porovnání s proteiny využívajícími pro vazbu iontů železa hem. Proteiny

s FeS centry jsou například součástí komplexu III dýchacího řetězce mitochondrií (tzv. Rieskeho proteiny) [8].

Hem je organická molekula tvořená čtyřmi pyrolovými jádry propojenými čtyřmi methinovými můstky do cyklického útvaru. Na uhlíkových atomech pyrolových jader neúčastnících se tvorby methinových můstků může docházet k substituci. Pokud jsou substituovány všechny zmíněné uhlíkové atomy, vzniká útvar zvaný porfyrin. Typ a uspořádání jednotlivých substituentů jsou charakteristické pro konkrétní izomer. Protoporfyrin IX je jedním z těchto izomerů, který obsahuje dva vinylové, dva propionátové a čtyři methylové substituenty v pozicích dle obrázku 1. Vyskytuje-li se ve středu protoporfyrinu IX ion železa vázaný ke čtyřem dusíkům pyrolových jader, nazývá se tato struktura hem b (viz obrázek 1) [9,10]. Stejně jako volné ionty železa, je i volný hem toxický a ve vodných roztocích málo rozpustný [11]. Koncentrace volného hemu v buňce o hodnotě 1 $\mu mol.l^{-1}$ a vyšší způsobuje nadměrnou tvorbu reaktivních forem kyslíku a představuje tak pro buňku zátěž oxidačně-redukčním stresem [12].



Obrázek 1 - Struktura hemu b tvořená protoporfyrinem IX, v jehož centru je koordinován ion železa. Převzato z [13].

Přísná regulace syntézy, distribuce a degradace hemu je z důvodu toxicity jeho volné formy pro živý organismus naprosto nezbytná [14]. Regulace na úrovni biosyntézy hemu

v buňce je realizována především prostřednictvím enzymu synthasa δ-aminolevulové kyseliny (ALA-synthasa). Tento enzym katalyzuje první krok biosyntézy hemu, tvorbu δ-aminolevulové kyseliny z glycinu a sukcinyl-CoA, probíhající v mitochondriích [15]. Pro regulaci degradace hemu v buňce je klíčový mikrosomální enzymový systém hemoxygenasy (HO) a nikotinamidadenindinukleotidfosfát(NADPH)-cytochrom P450 reduktasy. Konečnými produkty degradace hemu jsou bilirubin, oxid uhelnatý a ion železa [16]. Vznikající ion železa musí být z důvodu jeho zmíněné toxicitě, ale také jeho vzácnosti pro organismus, ihned využit. K tomuto účelu slouží proteiny s vysokou afinitou pro ionty železa, jako jsou například feritin, transferin, hepcidin a další proteiny umožňující uskladnění, transport či adsorpci iontů železa [17]. Analogicky obsahuje většina organismů proteiny s vysokou afinitou k hemu, které jsou aktivovány při jeho nadbytku a umožňují detoxikaci hemu díky tvorbě komplexu s ním (např. hemopexin). Následně může být takto vázaný hem transportován a využit pro fyziologické procesy [18].

Molekula hemu má také schopnost interagovat s určitými úseky DNA. Tato interakce nastává především v oblastech DNA obsahujících velký počet deoxyguanosinových nukleotidů tvořících tzv. G-kvadruplexy tvořené rovinami tzv. G-kvartetů. Podstatou tohoto procesu jsou π-π stohovací (tzv. „stacking“) interakce mezi porfyrinovou skupinou hemu a rovinami G-kvartetů. Vzniklé komplexy DNA s navázaným hemem mohou vykazovat peroxidasovou aktivitu. Nicméně přesný mechanismus vzniku těchto komplexů a jejich funkce nejsou přesně známy [19,20].

Jednou z forem hemu využitelnou pro experimentální účely je chlorid ferriprotoporfyrinu IX, tzv. hemin [21]. Hemin vykazuje tendenci agregovat především ve vodných roztocích [22].

Základní charakteristikou hemoproteinů je výskyt molekuly hemu jako prosthetické skupiny v jejich struktuře. Hemoproteiny byly poprvé popsány v polovině devatenáctého století [23], nicméně první známá struktura hemoproteinu myoglobinu byla publikována až přibližně o sto let později [24]. Díky širokému rozšíření ve všech živých organismech, od mikroorganismů až po člověka, představují hemoproteiny klinicky významné biomolekuly [25]. Vazba hemu ke struktuře hemoproteinů je umožněna díky schopnosti iontu železa v hemu vytvářet kromě čtyř vazeb s pyrolovými jádry až dvě další koordinačně kovalentní vazby s postranními řetězci aminokyselin. Váže-li se ion železa v hemu k proteinovému řetězci pouze jednou vazbou, nazývá se takový ion železa pentakoordinovaný. Pentakoordinovaný ion železa obsahuje stále jedno volné vazebné místo umožňující interakci s ligandy (např. molekulami plynu). Hexakoordinovaný ion železa

v hemu využívá obě volná vazebná místa pro interakci s postranními řetězci aminokyselin daného hemoproteinu nebo s jinými ligandy [10]. Výskyt těchto forem v hemoproteinech dokazuje, že interakce mezi hemem a proteiny není zprostředkována jedním specifickým vazebným motivem. Dle literatury lze rozlišit více než dvacet strukturních motivů proteinů schopných vázat molekulu hemu jako prosthetickou skupinu [26]. Změna oxidačně-redukčního stavu iontu železa v hemu může pozměnit strukturu vazebného místa či schopnost interakce hemu s ligandy a tím ovlivnit funkci celého hemoproteinu. Příkladem je hemoglobin, který při oxidaci iontu železa v hemu a tvorbě tzv. methemoglobinu ztrácí schopnost vazby molekuly kyslíku a tím i možnost transportovat tuto molekulu [27].

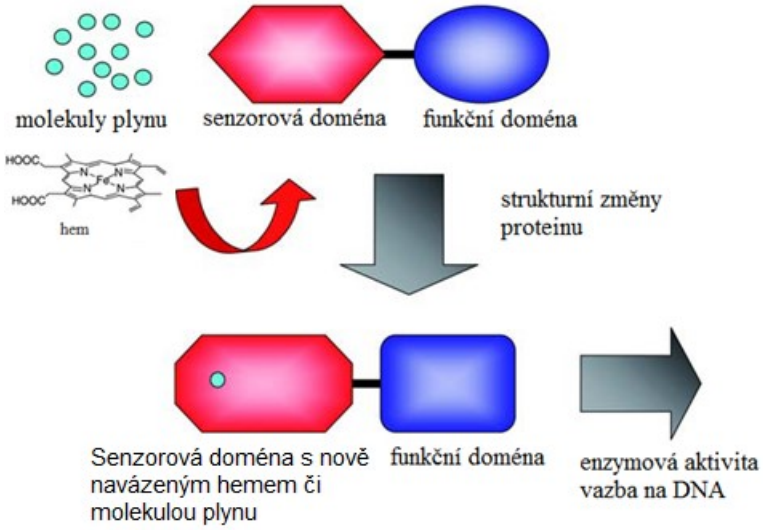
Hemoproteiny lze rozlišit dle mnoha kritérií, například podle strukturního motivu pro vazbu hemu, oxidačně-redukčního stavu iontu železa v hemu či dle výskytu v organismech. V literatuře je nicméně nejrozšířenějším kritériem pro rozdělení hemoproteinů jejich funkce v živých organismech, podle níž lze členit hemoproteiny do čtyř skupin [28]:

1) Participace na procesech přenosu a uchování kyslíku v krvi a tkáních patří mezi nejvýznamnější funkce hemoproteinů. Do této skupiny patří například hemoglobin či myoglobin, v nichž je kyslík vázán jako ligand hemového iontu železa [29].
2) Některé hemoproteiny vykazují enzymovou aktivitu. Umožňují například katalýzu reakcí, v nichž vystupuje jako jeden z reaktantů molekulární kyslík či peroxid vodíku. Příkladem enzymu využívajícího pro oxidace molekulární kyslík, k jehož aktivaci dochází v aktivním centru enzymu (toto aktivní centrum obsahuje hem), je cytochrom P450 [28]. Peroxid vodíku využívají organismy v některých případech také jako oxidační činidlo (peroxidasa). Důležitý je ale také enzym katalasa rozkládající peroxid vodíku a chránící tak organismy před oxidačně-redukčním stresem [30].
3) Hemoproteiny ve formě cytochromů jsou důležitou součástí mitochondriálního systému přenosu elektronů v dýchacím řetězci. Cytochromy zpravidla neobsahují ve své struktuře hem b, ale některý z jeho analogů lišící se postavením a typem substituentů na uhlících pyrolových jádrech neúčastnících se tvorby methinových můstků. Tato odlišná substituce umožňuje cytochromům získávat vzájemně odlišné hodnoty jejich elektrochemických potenciálů, které jsou důležité pro správný chod dýchacího řetězce [31].
4) V poměrně nedávné době byla identifikována nová skupina hemoproteinů, tzv. hemové senzorové proteiny. Hem sám o sobě představuje v těchto proteinech

signální molekulu či signální vazebné místo ovlivňující aktivitu těchto proteinů. Hemové senzorové proteiny lze dle formy signálu, jenž detekují, rozdělit na hemové senzorové proteiny, které detekují plynné molekuly a senzorové proteiny, které detekují hem [28].

2.2 Hemové senzorové proteiny

Charakteristickým strukturním rysem obou podskupin hemových senzorových proteinů je výskyt nejméně dvou esenciálních domén, tzv. senzorové domény a funkční domény. Vazebné místo pro hem je lokalizováno v oblasti senzorové domény. V případě senzorových proteinů, které detekují hem, se jedná o slabou reverzibilní vazbu hemu se senzorovou doménou. Na druhou stranu hemové senzorové proteiny, které detekují plynné molekuly, disponují schopností vázat hem v senzorové doméně mnohem silněji. Díky této skutečnosti představuje hem v senzorové doméně hemových senzorových proteinů, které detekují plynné molekuly, interakční místo pro příslušné plynné molekuly [32]. Signalizace prostřednictvím hemových senzorových proteinů zahrnuje detekci hemu, respektive plynné molekuly senzorovou doménou, tzv. primární signál, který pravděpodobně vede ke změně konformace celé senzorové domény. Tento signál je následně přenesen do funkční domény jako tzv. sekundární signál (pravděpodobně doprovázený konformační změnou funkční domény). Tento sekundární signál následně ovlivňuje enzymovou aktivitu příslušných proteinů, případně jejich schopnost regulovat procesy transkripce či interakce s DNA (viz obrázek 2) [28]. Nicméně přesný mechanismus detekce a strukturní změny, jež doprovází tuto signalizaci, nejsou ve většině případů zcela objasněny [32].



Obrázek 2 - Detekce signálu a jeho přenos v hemových senzorových proteinech. V případě hemových senzorových proteinů, které detekují plynné molekuly, je hem již pevně navázán ve struktuře senzorové domény a primární signál představuje vazba plynné molekuly. Pro senzorové proteiny, které detekují hem, představuje primární signál vazba hemu do struktury senzorové domény. Převzato z [28] a upraveno.

2.3 Hemové senzorové proteiny detekující plynné molekuly

Jedná se o podskupinu hemových senzorových proteinů, jejichž senzorová doména je zpravidla N-terminální. V této doméně se vyskytuje relativně pevně vázaná molekula hemu, která vykazuje schopnost detekce dvouatomových plynných molekul kyslíku, oxidu dusnatého a oxidu uhelnatého [32]. V současnosti je v literatuře hojně diskutována možnost detekce plynných molekul sulfanu, respektive hydrogensulfidových iontů (HS^- iontů) hemovými senzorovými proteiny [33]. Při dostatečném množství příslušných dvouatomových molekul se tyto molekuly váží jako šestý ligand na ion železa v hemu. Funkční doména hemových senzorových proteinů, které detekují plynné molekuly, se vyskytuje nejčastěji na C-konci těchto proteinů [32].

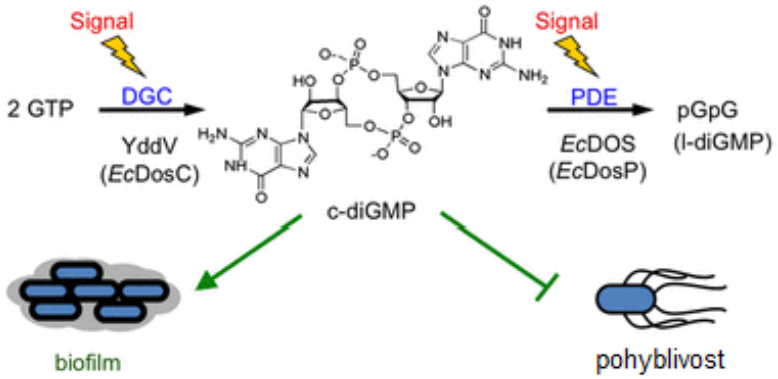
Hemové senzorové proteiny, které detekují plynné molekuly, se v největší míře vyskytují v bakteriích. V současnosti je známo pět strukturních motivů, které mohou tvořit domény schopné vázat molekulu hemu a zároveň umožnit jejím prostřednictvím detekci plynných molekul. Jedná se o PAS doménu (akronym odvozený z anglických názvů tří proteinů, ve kterých se tento strukturní motiv vyskytuje: „*Drosophila* **p**eriod clock protein“, „vertebrate **a**ryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ a „*Drosophila* **s**ingle minded protein“), GAF doménu (akronym odvozený z anglických názvů proteinů, ve kterých se tento

strukturní motiv objevuje: „c**G**MP specific phospodiesterases“, „**a**denyl cyclases“ a „*E. coli* **f**ormate hydrogenlyase transcriptional activator”), globinovou doménu, H-NOX doménu (z anglického „**h**eme-**n**itric **ox**ide binding domain“) a CooA doménu (doména senzorového proteinu, který detekuje oxid uhelnatý, CooA pochází z anglického názvu „**CO**-**O**xidation **A**ctivator protein“). PAS doména, GAF doména a globinová doména umožňují detekci molekul kyslíku, H-NOX doména detekci oxidu dusnatého a CooA doména umožňuje detekci molekul oxidu uhelnatého [34,35].

2.3.1 Hemové senzorové proteiny detekující kyslík

Kyslík představuje v biologických systémech konečný akceptor elektronů v procesech aerobního metabolismu, nicméně se jedná také o velmi významnou signální plynnou molekulu, obzvláště pro organismy, které jsou schopny rovněž anaerobního metabolismu. Hemové senzorové proteiny schopné detekovat tuto molekulu obsahují ve své struktuře jednu z domén schopných vazby hemu a následné detekce kyslíku prostřednictvím této molekuly. Jde buď o GAF doménu nebo PAS doménu, případně o doménu s globinovou strukturou [36].

Diguanylátcyklasa s globinovou strukturou senzorové domény (YddV) je jedním z příkladů hemových senzorových proteinů, které detekují kyslík. Společně s dalším kyslíkovým senzorem *Ec*DOS (z anglického „***E**scherichia **c**oli* **d**irect **o**xygen **s**ensor“) vytváří komplex regulující koncentraci cyklického diguanosinmonofosfátu (c-di-GMP) v bakteriálních buňkách [37]. V *E. coli* je tvorba tohoto komplexu usnadněna výskytem genů pro oba proteiny v jediném operonu [38]. YddV obsahuje senzorovou doménu s globinovou strukturou, zatímco *Ec*DOS disponuje PAS doménou. Funkční doména proteinu YddV vykazuje diguanylátcyklasovou aktivitu, tedy schopnost katalyzovat syntézu c-di-GMP z dvou molekul GTP v buňce, zatímco funkční doména proteinu *Ec*DOS vykazuje fosfodiesterasovou aktivitu (viz obrázek 3) [39]. Koncentrace c-di-GMP v buňce ovlivňuje mnoho fyziologických procesů, z nichž klinicky nejvýznamnější je přechod bakterií do stádia, ve kterém tvoří jednotlivé buňky souvislý povlak, tzv. biofilm. Jedná se o souhrn morfologických a fyziologických změn vedoucí k přechodu bakterií do metabolicky klidového stadia, v němž vykazují vyšší míru rezistence vůči antibiotikům i imunitnímu systému svého hostitele [40,41]. YddV a *Ec*DOS či další analogické proteiny participující na procesech ovlivňujících koncentraci c-di-GMP v buňce patří mezi nejvíce zastoupené proteiny v genomech většiny bakterií [42].



Obrázek 3 - Proces syntézy a degradace cyklického diguanosinmonofosfátu (c-di-GMP) v bakteriální buňce. Syntéza c-di-GMP je katalyzována proteinem YddV, který vykazuje diguanylátcyklasovou aktivitu. Linearizace (degradace) c-di-GMP je uskutečňována díky fosfodiesterasové aktivitě *Ec*DOS. Převzato z [39] a upraveno.

Globinová doména proteinu YddV má strukturu velmi podobnou globinovému prostorovému uspořádání podjednotky hemoglobinu či molekule myoglobinu, nicméně účel vazby molekuly kyslíku v případě YddV je jiný - představuje signál, který reguluje následné děje [39]. Konkrétně vazba kyslíku na senzorovou doménu YddV (respektive na ion železa ve struktuře hemu, který je v senzorové doméně lokalizován) spouští signální mechanismus vedoucí k aktivaci diguanylátcyklasové aktivity, pro niž je nezbytná přítomnost hořečnatých iontů [43]. Protein YddV se v roztoku nachází převážně ve formě dimeru, nicméně stabilita tohoto dimeru je v případě plnodélkového proteinu poměrně nízká a často dochází k tvorbě oligomerů YddV [44]. Vyskytuje-li se ion železa hemu vázaného v senzorové doméně YddV ve formě Fe(III) či Fe(II)-O_2, je YddV v aktivním stavu. Dojde-li k redukci iontu železa v nepřítomnosti molekuly kyslíku, tj. vzniká Fe(II) forma, je YddV neaktivní [36]. Pravděpodobně nejvýznamnější aminokyselinou, která se vyskytuje v aktivním centru senzorové domény YddV, je aminokyselina Tyr43. Její význam spočívá ve stabilizaci molekuly kyslíku v aktivním centru, která je uskutečňována tvorbou vodíkových můstků mezi Tyr43 a molekulou kyslíku [45]. Rovněž Leu65 je významnou součástí zmíněného aktivního centra. Význam této aminokyseliny rovněž spočívá ve stabilizaci navázaného kyslíku v aktivním centru, přičemž Leu65 zabraňuje přístupu molekul vody do aktivního centra [46].

Fosfodiesterasová aktivita proteinu *Ec*DOS je při vazbě kyslíku na jeho senzorovou doménu značně zvýšena [47]. Tato aktivita dosahuje mnohem vyšších hodnot v porovnání s diguanylátcyklasovou aktivitou YddV. Vzhledem k společné participaci proteinů YddV a *Ec*DOS na regulaci koncentrace c-di-GMP v buňce se zdá být tvorba c-di-GMP rychlost

určujícím krokem celého tohoto procesu, a tedy důležitým faktorem ovlivňujícím fyziologický stav buňky [48].

2.3.2 Hemové senzorové proteiny detekující oxid dusnatý

Oxid dusnatý představuje další významnou signální plynnou molekulu. Syntéza oxidu dusnatého probíhá v lidském organismu díky aktivitě enzymu NO synthasy, jenž katalyzuje přeměnu L-argininu na citrulin a oxid dusnatý za spotřeby dvou molekul NADPH a dvou molekul kyslíku [49].

Typickým zástupcem skupiny hemových senzorových proteinů, které detekují oxid dusnatý, je solubilní guanylátcyklasa (sGC). Tento eukaryotický senzor oxidu dusnatého vykazuje guanylátcyklasovou aktivitu, tedy schopnost syntetizovat cyklický guanosinmonofosfát (cGMP) [50]. Význam cGMP pro organismus dokládá participace této signální molekuly na procesech umožňujících relaxaci hladké svaloviny cév či regulujících srážlivost krve. Vliv oxidu dusnatého na tyto procesy je tedy nepřímo umožněn prostřednictvím sGC a cGMP [51]. Vazba oxidu dusnatého na sGC může probíhat díky přítomnosti specifické domény, tzv. H-NOX domény (z anglického „**h**eme-**n**itric **ox**ide binding domain“) vyskytující se v rámci senzorové domény sGC na jejím N-konci. Protein sGC vykazuje po navázání oxidu dusnatého na H-NOX doménu zvýšenou guanylátcyklasovou aktivitu [52]. Doménou H-NOX disponují také prokaryotické senzory oxidu dusnatého, ovlivňující různorodé funkce příslušných organismů, jako je tvorba biofilmu, chemotaxe, případně vystupují tyto proteiny jako transkripční faktory [53]. Některé z těchto prokaryotických senzorových proteinů nejsou zcela specifické pro detekci oxidu dusnatého a umožňují za určitých podmínek vázat do struktury senzorové domény molekulu kyslíku [54], na rozdíl od eukaryotické sGC, která je minimálně o dva řády specifičtější pro detekci oxidu dusnatého než pro všechny ostatní dvouatomové plynné molekuly [55].

2.3.3 Hemové senzorové proteiny detekující oxid uhelnatý

Oxid uhelnatý je signální plynná molekula vyskytující se v téměř všech živých organismech. Prokaryotické organismy mají schopnost utilizovat oxid uhelnatý z okolního prostředí. Hlavním zdrojem oxidu uhelnatého v lidském organismu je proces degradace hemu katalyzovaný hemoxygenasou (viz kapitola 2.1) [56].

Cystathion-β-synthasa je eukaryotický protein, jenž katalyzuje syntézu cystathioninu ze serinu a homocysteinu. Tato reakce představuje součást procesu odbourávání methioninu a biosyntézy cysteinu. Cystathion-β-synthasa je klíčový enzym degradace homocysteinu v lidském organismu. Pokud dojde k defektu v katalytické aktivitě cystathion-β-synthasy,

může v organismu nastat v důsledku neschopnosti degradace homocysteinu stav tzv. hyperhomocysteinemie. Přetrvává-li tento patologický stav dlouhodobě, může způsobit těžké kardiovaskulární potíže [57]. Lidská forma cystathion-β-synthasy je schopna vázat prostřednictvím hemu v senzorové doméně molekulu oxidu uhelnatého, ale také oxidu dusnatého. Vazba kterékoli z těchto signálních plynných molekul způsobuje inhibici enzymové aktivity cystathion-β-synthasy. Aktivitu tohoto enzymu ovlivňuje také oxidoredukční stav iontu železa v hemu. Je-li tento ion ve stavu Fe(III), vykazuje cystathion-β-synthasa přibližně dvojnásobné zvýšení aktivity oproti stavu Fe(II) [32].

2.3.4 Vliv sulfanu a polysulfidů na hemové senzorové proteiny

V současnosti je hojně diskutována role sulfanu jako čtvrté signální plynné molekuly ve fyziologických procesech probíhajících v živých organismech. Molekula sulfanu se může účastnit regulace oxidačně-redukčního stresu a přispívat k rozpadu disulfidových můstků vyskytujících se na povrchu proteinů [58]. Sulfan vykazuje schopnost interagovat s reaktivními formami kyslíku, nicméně přímé vychytávání těchto sloučenin nebylo popsáno. Vliv sulfanu na oxidačně-redukční stav v buňce je zprostředkován také jeho schopností regulovat přenos elektronů v dýchacím řetězci [59].

Hodnota p*K*a pro sulfan je přibližně 6,9. Díky této skutečnosti může za běžného fyziologického pH intracelulární tekutiny většiny buněk, včetně buněk lidských (tedy pH přibližně 7,4) interagovat HS^- s hemovým iontem železa ve stavu Fe(III), který je součástí struktury většiny hemoproteinů. Jsou-li aminokyseliny tvořící okolí vázaného hemu vhodně prostorově orientovány, může nastat redukce komplexu Fe(III)-SH na formu Fe(II)-SH [33]. Dokladem tvorby zmíněných komplexů je schopnost iontu HS^- interagovat s iontem železa v hemu vázaným ve struktuře typických hemoproteinů hemoglobinu a myoglobinu [60]. V přítomnosti peroxidu vodíku může nastat proces vedoucí k tvorbě verdohemu či sulfhemu. Jedná se o modifikace hemu spočívající v náhradě jedné z methinových skupin porfyrinové struktury za atom kyslíku (verdohem), respektive síry (sulfhem). V současnosti nejsou známy žádné hemové senzorové proteiny specifické pro detekci molekul sulfanu v okolním prostředí [33].

Polysulfidy vykazují pravděpodobně řádově vyšší efekt na hemové senzorové proteiny než v předchozím odstavci zmíněný sulfan. Významné jsou především persulfidy, které vznikají reakcí sulfanu s disulfidy a sulfenovými kyselinami. Nejdůležitějším mechanismem signalizace zprostředkované sulfidy je pak persulfidace cílových proteinů. Nicméně vzhledem k relativně nízké reaktivitě sulfanu a nízké koncentraci disulfidů i sulfanu

za fyziologických podmínek je možnost vzniku persulfidů výše popsanou cestou poměrně diskutabilní. Na druhou stranu mechanismy odstraňování přebytečných sulfidů z buněk, které zahrnují metabolické oxidace síry mohou být významným zdrojem reaktivních sloučenin síry včetně persulfidů [59,61].

Sulfan a polysulfidy mají velký potenciál ovlivňovat mnohé z fyziologických funkcí hemových senzorových proteinů, nicméně detailní studie týkající se této problematiky nebyly dosud provedeny [33]. V přítomnosti sulfanu dochází k výraznému zvýšení fosfodiesterasové aktivity proteinu *Ec*DOS [62]. Tento vliv je pravděpodobně způsoben změnou struktury v okolí hemu a koordinačního stavu iontu železa v něm. Hemový ion železa vázaný v senzorové doméně proteinu *Ec*DOS je účinkem sulfanu přeměněn ze stavu Fe(III) do enzymově mnohem aktivnějšího stavu Fe(II) či Fe(II)-O_2 [63]. Výsledky získané při studiu efektu sulfanu na diguanylátcyklasovou aktivitu *Ec*DOS jsou v silném kontrastu s poznatky získanými při zkoumání vlivu sulfanu na kinasovou aktivitu dalšího hemového senzorového proteinu, který detekuje kyslík, histidinkinasy s globinovou strukturou senzorové domény z bakterie *Anaeromyxobacter sp.* (*Af*GcHK). Při interakci *Af*GcHK se sulfanem byl pozorován vznik komplexu Fe(III)-SH. Tento proces neměl zásadní vliv ani na aktivaci ani na redukci kinasové aktivity *Af*GcHK [64].

2.4 Senzorové proteiny detekující hem

Senzorové proteiny, které detekují hem představují druhou významnou podskupinu hemových senzorových proteinů. Jedná se o proteiny s vysokou citlivostí pro změny koncentrace volného hemu v jejich bezprostředním okolí. Změna koncentrace volného hemu tak významně reguluje funkce těchto senzorů [32]. Mechanismus regulace senzorových proteinů, které detekují hem, byl nastíněn v kapitole 2.2.

Reverzibilní interakce hemu, respektive iontu železa v něm obsaženém, se senzorovou doménou senzorových proteinů, které detekují hem, je ve většině případů umožněna prostřednictvím thiolátové skupiny cysteinu proteinového řetězce, která tvoří axiální ligand hemu. Síla vazby mezi ní a iontem železa v hemu není příliš silná. Tato skutečnost je klíčová pro schopnost zmíněných proteinů pohotově reagovat na nadbytek i nedostatek hemu v buňce. Oxidační stav iontu železa v hemu je schopen do značné míry regulovat sílu zmíněné vazby, která je v případě stavu Fe(III) silnější ve srovnání se stavem Fe(II). V případě nedostatku hemu v buňce nedochází k jeho vazbě na senzorovou doménu a hem je tak k dispozici pro fyziologické procesy, které tuto molekulu vyžadují. Nadbytek hemu v buňce naopak

umožňuje vazbu této molekuly na senzorovou doménu i přes nízkou sílu (efektivitu) popsané interakce [28].

Typickým vazebným místem hemu umožňujícím jeho detekci v senzorových proteinech, které detekují hem, je thiolátová skupina aminokyseliny cysteinu, která tvoří součást tzv. CP motivu [28]. Tento motiv je tvořen aminokyselinami cysteinem a prolinem, které spolu sousedí v rámci polypeptidového řetězce [65]. Význam prolinu spočívá v jeho schopnosti regulovat sílu interakce mezi hemovým iontem železa a thiolátovou skupinou cysteinu [66,67]. Prolin totiž umožňuje regulovat flexibilitu postranního řetězce cysteinu a zároveň jeho vzdálenost od základního polypeptidového řetězce. Stejně jako pro vazbu hemu, jsou specifické vlastnosti CP motivu esenciální také pro disociaci hemu ze senzorové domény senzorových proteinů, které detekují hem. Tato disociace je obvykle doprovázena redukcí iontu železa v hemu ze stavu Fe(III) do stavu Fe(II). Záporně nabitá thiolátová skupina cysteinu totiž vykazuje nižší afinitu k méně nabitému iontu železa ve stavu Fe(II) [28]. Významnou roli v regulaci této interakce pravděpodobně představuje aminokyselinové uspořádání v okolí cysteinu, respektive CP motivu. Některé proteiny, které nevykazují funkci senzorů hemu, jsou totiž schopny vázat i ion železa ve stavu Fe(II) prostřednictvím thiolátové skupiny cysteinu díky stabilizaci této interakce prostřednictvím vodíkových můstků tvořených okolními aminokyselinovými zbytky [68]. Dokladem relativně nízké síly interakce mezi hemovým iontem železa a thiolátovou skupinou cysteinu je disociační konstanta hemu, která má pro senzorové proteiny, které detekují hem hodnotu o přibližně tři řády vyšší než pro typické hemoproteiny (např. hemoglobin) [69,70]. Nicméně v nedávné době byly popsány také jiné motivy vazby hemu v senzorové doméně. Byly také objeveny CP motivy bez schopnosti vázat hem popsaným způsobem. Pouhou analýzu výskytu CP motivů v polypeptidovém řetězci tedy nelze využít pro jednoznačné zařazení proteinů do skupiny senzorových proteinů, které detekují hem [32].

Jak již bylo uvedeno výše, změna oxidačního stavu (tj. oxidačního čísla) iontu železa v hemu je jedním z faktorů ovlivňujících sílu vazby mezi iontem železa v hemu a thiolátovou skupinou cysteinu v senzorové doméně senzorových proteinů, které detekují hem. U některých zástupců hemových senzorových proteinů byl popsán proces záměny ligandů hemu, který probíhá v závislosti na redoxním stavu hemového iontu železa. Při redukci iontu železa ze stavu Fe(III) do stavu Fe(II) dochází k záměně thiolátového ligandu cysteinu za jiný ligand, jehož interakce s iontem železa ve stavu Fe(II) je výhodnější [32]. Typickým ligandem, který preferuje interakci s iontem železa ve stavu Fe(II) je imidazolový postranní řetězec histidinu. Oba výše popsané procesy spojené se změnou redoxního stavu iontu železa

v hemu umožňují senzorovým proteinům, které detekují hem, příslušně reagovat na změny redoxního stavu buňky a regulovat tak faktory přispívající k oxidačně-redukčnímu stresu. Vazba či disociace hemu ze senzorové domény, případně záměna jeho ligandů, totiž indukují strukturní změny v senzorové doméně. Tyto změny představují signál, jenž se přenáší do funkční domény, a mohou tak ovlivnit funkce příslušných proteinů [28].

Charakteristickým rysem senzorových proteinů, které detekují hem, je rovněž jejich flexibilita. Dojde-li k mutaci axiálních ligandů hemu, například thiolátového řetězce cysteinu v rámci CP motivu, mohou popsané proteiny využít pro vazbu hemu jiné ligandy v bezprostředním okolí. Popsaný jev byl prokázán s využitím absorpční spektroskopie, kdy mutace příslušných ligandů nezapříčinila změnu absorpčních spekter jednotlivých proteinů [71,72]. Většina senzorových proteinů, které detekují hem, navíc obsahuje rozsáhlé nestrukturované oblasti. Vazba hemu či jeho disociace v rámci senzorové domény mohou způsobit rozsáhlé strukturní změny, které se velmi dynamicky šíří jako signál ze senzorové do funkční domény. V průběhu tohoto procesu může dojít ke zformování strukturních motivů v původně nestrukturovaných oblastech senzorových proteinů, které detekují hem, či naopak k relaxaci uspořádané struktury. Flexibilita popsaných proteinů je tedy esenciální pro správné vykonávání jejich funkcí [71,73].

2.4.1 Inhibitor proteosyntézy regulovaný hemem (HRI)

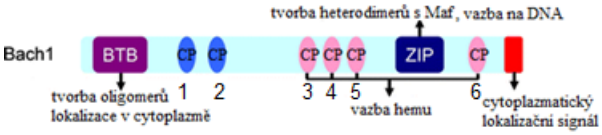
Jedná se o modelový příklad senzorových proteinů, které detekují hem. Kinasa eukaryotického iniciačního faktoru 2 alpha (eIF2α), která je inhibována hemem (alternativně označována také jako inhibitor proteosyntézy regulovaný hemem, HRI) představuje protein ze skupiny eIF2α kinas, který umožňuje fosforylaci hydroxylové skupiny postranního řetězce Ser51 (ve struktuře eIF2α). HRI se vyskytuje převážně v retikulocytech, tj. v raném vývojovém stádiu červených krvinek. Koncentrace hemu v retikulocytech, tedy jeho dostupnost, ovlivňuje aktivitu HRI. Pokrývá-li množství hemu v retikulocytech všechny nezbytné procesy, dochází k vazbě nadbytečného hemu na senzorovou doménu HRI. Důsledkem této vazby je inhibice kinasové aktivity HRI, Ser51 ve struktuře eIF2α není fosforylován a proteosyntéza může pokračovat, což umožňuje syntézu globinu a následnou tvorbu hemoglobinu v retikulocytech. Naopak nedostatek hemu v retikulocytech způsobuje disociaci této molekuly ze senzorové domény HRI. Zmíněná disociace umožňuje využití hemu pro fyziologické potřeby buňky. Navíc dochází ke strukturním změnám HRI vedoucím k jeho autofosforylaci a následné fosforylaci eIF2α. Popsané děje způsobují inhibici syntézy globinu v retikulocytech, aby nedocházelo k jeho patologickému hromadění. Také nedostatek

hemu v retikulocytech, který je důsledkem řady patologických stavů jako například erytropoetické protoporfyrie nebo β-thalasemie, představuje pro tyto buňky stresující faktor. HRI svou aktivitou reguluje míru oxidačně-redukčního stresu retikulocytů a napomáhá optimální syntéze hemoglobinu udržováním stabilního molárního poměru hemu a globinu (1:1) v těchto buňkách. Vazba hemu v rámci HRI způsobuje významné strukturní změny tohoto proteinu, které vedou ke vzniku interakce mezi senzorovou doménou na C-konci a kinasovou doménou představující N-konec HRI. Hem využívá pro interakci se senzorovou doménou thiolátovou skupinu cysteinu, zatímco vazba s kinasovou doménou je umožněna díky interakci s imidazolovou skupinou histidinu [32].

2.4.2 Bach1

Bach1 je dalším zástupcem senzorových proteinů, které detekují hem. Název tohoto proteinu vychází z pojmenování jeho důležité domény, tzv. BTB domény (z anglického názvu „**B**road complex – **T**ramtrack – **B**rick – a – brack domain“) a ze skupinového pojmenování třídy transkripčních faktorů, jíž je Bach1 součástí (tzv. CNC rodina, z anglického názvu „**C**ap'**n**'**C**ollar“). Jedná se tedy o tzv. **B**TB **a** **C**NC **h**omolog **1** (Bach1) [74]. Hlavním místem výskytu Bach1 je jádro a cytoplazma hematopoetických buněk [75]. V současnosti je hojně diskutována role Bach1 ve vývoji zárodečných buněk [76]. Myší forma tohoto proteinu, která byla zkoumána v rámci této diplomové práce, má o tři aminokyseliny více než příslušná lidská forma a vykazuje s ní 88% shodu. Celková molekulová hmotnost myší formy Bach1 činí 81 374 Da [77,78]. BTB doména, z níž vychází název proteinu Bach1, se nachází na jeho N-konci a představuje interakční místo umožňující proteinu Bach1 tvorbu oligomerů s dalšími proteinovými interakčními partnery. Kromě toho determinuje pravděpodobně BTB doména v kooperaci s dalšími faktory lokalizaci Bach1 v rámci buňky [79]. Bach1 obsahuje ve své struktuře celkem šest CP motivů, z nichž čtyři se vyskytují v C-koncové oblasti tohoto proteinu. Tyto CP motivy označované jako CP-3 až CP-6 pravděpodobně představují interakční místa pro vazbu hemu do struktury Bach1 [80]. Další důležitou komponentou Bach1, která se rovněž vyskytuje poblíž jeho C-konce, je doména bohatá na uspořádání umožňující tvorbu tzv. bazických leucinových zipů. Tato doména je místem interakce se svalovoaponeurotickým fibrosarkomovým proteinem K (MafK, z anglického „**m**usculo**a**poneurotic **f**ibrosarcoma protein **K**“), významným vazebným partnerem proteinu Bach1. Jelikož Bach1 pravděpodobně nedokáže dostatečně slině interagovat s DNA, je tvorba heterodimeru Bach1-MafK klíčová pro správnou funkci tohoto transkripčního faktoru [81]. Třetí významnou komponentu C-koncové části Bach1 představuje oblast nazývaná jako

cytoplazmatický lokalizační signál, která po „obdržení“ příslušného signálu pravděpodobně indukuje export Bach1 z jádra a reguluje tak lokalizaci Bach1 v rámci buňky [82]. Umístění všech významných strukturních domén a motivů tvořících součást struktury Bach1 schematicky znázorňuje obrázek 4.



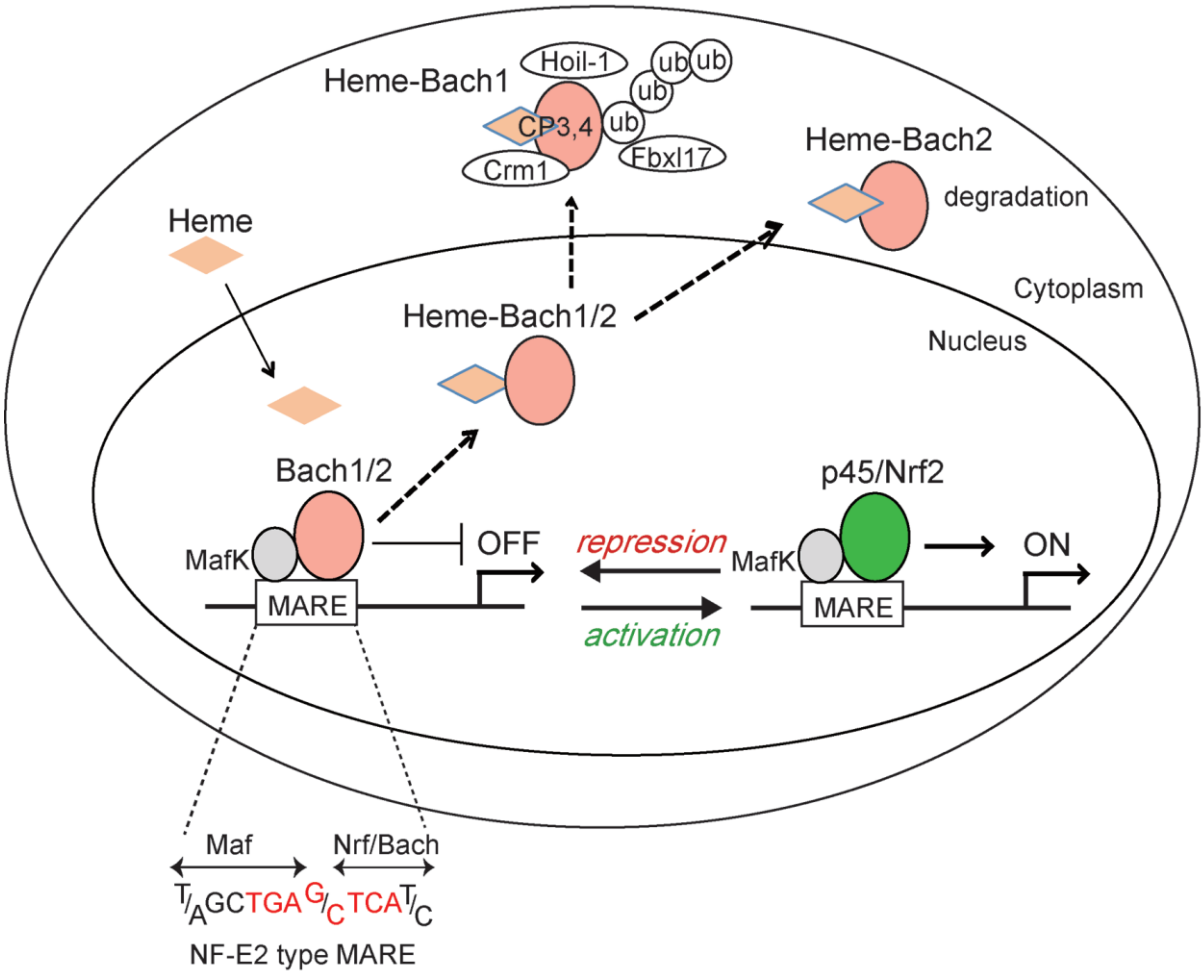
Obrázek 4 - Významné strukturní motivy a domény proteinu Bach1 ve schematickém nákresu. Převzato z [74].

Fyziologickou funkcí proteinu Bach1 je regulace transkripce genů pro hemoxygenasu-1 (HO-1), klíčový enzym degradace hemu v buňce. V případě interakce Bach1 s DNA inhibuje tento protein transkripci genů pro HO-1, působí tedy jako negativní regulátor, tzv. represor [81]. Stejným mechanismem reguluje Bach1 pravděpodobně také transkripci genů pro proteiny ferritin a transferin, které mají důležitou roli v distribuci iontů železa uvolněných v procesu degradace hemu [79]. Specifická a silná interakce s DNA je umožněna vazbou heterodimeru Bach1-MafK na Maf rozpoznávací oblast (MARE, z anglického „**Ma**f **r**ecognition **e**lement“) ve struktuře DNA [81]. MARE oblast je specifická pro vazbu proteinů rodiny Maf, do níž patří také MafK. MARE oblast tvoří konzervovaná palindromatická sekvence čtrnácti nukleotidů TGCTGACGTCAGCA. Krajní trojice nukleotidů (tedy TGC a GCA) jsou zodpovědné za rozpoznání specifických vazebných domén Maf proteinů [83]. Maf proteiny představují poměrně konzervovanou skupinu proteinů, jejichž sekvenci tvoří zpravidla přibližně 160 aminokyselin o celkové molekulové hmotnosti okolo 18 000 Da. Charakteristickým strukturním rysem Maf proteinů je poměrně četný výskyt oblastí nazývaných jako tzv. bazické leucinové zipy, které umožňují interakci s DNA i dalšími proteiny [84]. Typickým interakčními partnery Maf proteinů jsou proteiny z rodiny CNC faktorů a jim příbuzní zástupci [85].

Nedostatek volného hemu v buňce indukuje disociaci hemu ze senzorové domény Bach1, tvorbu heterodimeru Bach1-MafK a jeho následnou interakci s MARE oblastí v DNA. Důsledkem tohoto sledu procesů je represe transkripce genů pro HO-1, a tedy redukce odbourávání hemu v buňce [74]. V některých případech byla popsána také interakce mezi komplexy Bach1-MafK zprostředkovaná BTB doménami proteinu Bach1. Vzniklé oligomery tak mohou umožnit výrazné strukturní změny DNA a přiblížení v sekvenci

vzdálených MARE oblastí. Typicky indukuje tvorba těchto oligomerů vznik smyček a ohybů struktury DNA [86]. Tento jev představuje důležitý faktor regulace různých procesů na úrovni DNA [83].

Dojde-li k zvýšení koncentrace volného hemu v buňce, váže se tento volný hem do struktury senzorové domény proteinu Bach1 a indukuje disociaci komplexu Bach1-MafK z MARE a pravděpodobně i následný rozpad tohoto heterodimeru [74]. Popsaný proces schematicky znázorňuje obrázek 5. Navíc v případě potřeby buňka disponuje aparátem umožňujícím degradaci Bach1 s vázaným hemem prostřednictvím interakce Bach1 s ligasou HOIL-1 (z anglického „**h**eme-**o**xidized **I**RP2 ubiquitin **l**igase-**1**“, IRP2 z anglického „**i**ron **r**egulátory **p**rotein **2**“) [87]. Zvýšená koncentrace hemu v buňce navíc indukuje export Bach1 z jejího jádra, za nějž jsou pravděpodobně odpovědné motivy CP-3 až CP-6 spolu s příslušnými lokalizačními signály [82]. Tento stav umožňuje transkripci genů pro HO-1, která následně katalyzuje degradaci nadbytečných molekul volného hemu v buňce. Transkripce genů pro HO-1 je navíc pravděpodobně indukována vazbou heterodimeru jiného proteinu s některým z Maf proteinů do uvolněné MARE oblasti. Přesná identifikace tohoto teoreticky předpovídaného heterodimeru nebyla dosud provedena [74,81]. Některé buňky pravděpodobně využívají v případě nedostatku volného hemu proces opačný k popsanému jadernému exportu, tedy jaderný import Bach1 umožňující jeho jadernou akumulaci. Nicméně detaily obou těchto jaderných transportních procesů nebyly dosud zcela prozkoumány [82]. Bach1 všemi výše popsanými mechanismy přispívá k udržení homeostázy uvnitř buněk.



Obrázek 5 - Schematické znázornění funkce Bach1 v případě zvýšené koncentrace volného hemu v buňce. Při nízké koncentraci volného hemu nedochází k vazbě této molekuly do struktury Bach1, což umožňuje vazbu heterodimeru Bach1-MafK na oblast MARE a represi transkripce genů pro HO-1. V případě zvýšené koncentrace volného hemu interaguje tato molekula s Bach1, což způsobuje disociaci heterodimeru Bach1-MafK z MARE oblasti. Tato situace navíc vede pravděpodobně k vazbě jiného, dosud nespecifikovaného proteinu ve formě heterodimeru s některým z Maf proteinů (mohlo by se jednat taktéž o MafK) na uvolněnou MARE oblast. Výsledkem je indukce transkripce genů pro HO-1. Převzato z [79].

Interakce hemu s Bach1 dodnes nebyla plně popsána ani charakterizována, dokonce není znám ani přesný počet molekul, které mohou současně interagovat s Bach1. Pro tuto vazbu jsou klíčové především CP motivy. Experimenty využívající konstrukty Bach1 s různými kombinacemi použitých modifikací CP motivů prokázaly neschopnost motivů CP-1 a CP-2 vázat hem. Tyto motivy se nacházejí blíže k N-konci (viz obrázek 4). Motivy CP-3 až CP-6 vykazovaly schopnost vazby hemu, nicméně nebylo možno jednoznačně identifikovat, jaký je příspěvek jednotlivých CP motivů k celkové interakci [80]. K objasnění

tohoto problému by mohla přispět znalost přesného počtu molekul hemu, jejichž současná vazba v rámci struktury proteinu Bach1 je možná. Tato problematika dosud nebyla podrobně prozkoumána, nicméně předběžné experimenty se velmi liší ve svých závěrech a poukazují na schopnost proteinu Bach1 vázat jednu (experimenty využívající izotopické značení heminu pomocí ^{55}Fe [81]), respektive pět molekul hemu (titrace Bach1 heminem se spektrofotometrickou detekcí [80]). Počet molekul hemu, které se mohou současně vázat do struktury Bach1, ovlivňuje také mnoho dalších faktorů, jako je interakce s MafK či DNA, případně oxidoredukční stav iontu železa v hemu [80,81]. Roli v tomto procesu může hrát také tvorba disulfidových můstků, jelikož Bach1 obsahuje ve své struktuře relativně velký počet cysteinů (přesně 36) [78]. Detailní studie pokrývající alespoň některé z těchto faktorů však dosud nebyly provedeny.

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.1, představuje distribuce železa, respektive udržitelný metabolismus hemu v organismu důležitý faktor přispívající k regulaci oxidačně-redukčního stresu. Díky participaci Bach1 v procesu degradace hemu představuje tento senzor potenciální místo terapeutického zásahu. Především by mohla regulace aktivity proteinu Bach1 napomoci s léčbou kardiovaskulárních problémů či poruch krvetvorby. Vzhledem k participaci Bach1 v procesu tvorby a vývoje komponent imunitního systému, jako jsou makrofágy či dendritické buňky, by mohlo být v budoucnu možno využít regulace aktivity Bach1 při léčbě některých autoimunitních onemocnění. Vzhledem ke komplexnosti funkcí, kterých se Bach1 v organismu účastní, nelze vyloučit roli tohoto proteinu ani v některých dalších fyziologických či patologických procesech [79].

2.5 Spektrofotometrická detekce molekul hemu, respektive iontu železa

2.5.1 Absorpce viditelného záření molekulou hemu

Porfyrinový skelet je díky obsahu rozsáhlého systému konjugovaných dvojných vazeb schopen absorbovat světelné záření. Pokud je hem rozpuštěn ve vodném roztoku, nachází se maximum jeho absorbance přibližně při 367 nm. Tato absorpce vede nejprve ke vzniku excitovaného singletového stavu. Následně může nastat proces zvaný mezisystémové křížení vedoucí ke vzniku tripletového stavu. Tento tripletový stav má mnohem delší dobu života a může způsobit oxidaci biomolekul uvnitř živých organismů prostřednictvím singletového kyslíku. Jako příklad takovéto oxidace lze uvést oxidaci methioninu na methionin sulfoxid po ozáření v přítomnosti porfyrinů [88]. Hemová skupina vázaná ve struktuře hemoproteinů vykazuje charakteristický absorpční pík při asi 390 nm až 450 nm (tzv. Soretův pík) v závislosti na druhu hemoproteinu. Přesná poloha tohoto absorpčního píku se liší v závislosti

na oxidoredukčním stavu iontu železa v hemu, vazbě ligandů na tento ion a na strukturním uspořádání aminokyselin v okolí hemu v příslušných hemoproteinech [89]. V případě senzorových proteinů, které detekují hem, lze využít postupných přídavků molekul hemu do roztoku obsahujícího apoformu příslušného senzorového proteinu (tedy formu bez vázaných molekul hemu ve struktuře) spolu se spektrofotometrickou detekcí k určení počtu molekul hemu, jež se váží do struktury příslušného senzorového proteinu. V takovém případě lze při volbě vhodné koncentrace proteinu v roztoku a vhodných přídavcích hemu získat závislost absorbance při specifické vlnové délce (typicky vlnové délce odpovídající Soretovu píku) na množství přidaných molekul hemu. Křivka vystihující tuto závislost má dva lineární úseky s odlišnou směrnicí. První úsek má vyšší hodnotu směrnice a reprezentuje specifickou vazbu hemu do struktury senzorového proteinu, který detekuje hem. Druhý úsek s nižší hodnotou směrnice reprezentuje volnou molekulu hemu, jejíž absorpční pás zasahuje částečně i k vlnové délce Soretova píku. Proložením obou úseků regresními přímkami získáme jejich průsečík, z jehož polohy lze odečíst počet molekul hemu, které se specificky váží do struktury příslušného senzorového proteinu. Tento bod lze označit za „bod ekvivalence“ reprezentující saturaci příslušného hemového senzorového proteinu, který detekuje hem, molekulami hemu a takto použitou metodu lze nazvat titrací. Výše popsaný postup byl již dříve úspěšně aplikován na jiný hemový senzorový protein, HRI [69].

2.5.2 Detekce volných molekul hemu využívající pyridin

Jedná se o metodu specifickou pro detekci volných molekul hemu, respektive molekul hemu interagujících s proteinem po jeho disociaci z této vazby vlivem pyridinu a silně alkalického prostředí. Volné molekuly hemu jsou detekovány ve formě pyridinového hemochromogenu, tedy hemu s pyridinovou skupinou vázanou jako axiální ligand iontu železa v hemu. Po přídavku redukčního činidla, typicky dithioničitanu sodného, je získáno diferenční absorpční spektrum mezi oxidovanou a redukovanou formou hemu. Koncentraci volných molekul hemu v příslušném vzorku lze určit při znalosti rozdílu hodnot molárních absorpčních koeficientů a absorbancí mezi absorpčním maximem při 557 nm a minimem při 541 nm pomocí Lambertova-Beerova zákona [90].

2.5.3 Atomová absorpční spektrometrie

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) představuje metodu, která umožňuje stanovení prvkového složení látek ve formě roztoků či koncentrace příslušného prvku v roztoku. Principem této metody je stanovení absorbance při vlnové délce specifické pro dané atomy (respektive dané prvky), které musí být před samotným stanovením převedeny

do plynné fáze procesem tzv. atomizace. Atomizaci je nutno provádět za vhodných podmínek umožňujících převedení atomů prvků do plynné fáze bez jejich excitace. Proces atomizace lze provést pomocí plamenové techniky, kdy dochází k atomizaci prvků pomocí plamenu, případně prostřednictvím elektrotermické atomizace (ETA) či technikou generování a atomizace těkavých sloučenin. Vzhledem k velmi úzkým absorpčním pásům atomů prvků a neexistenci monochromátorů specifických pro takto úzkou oblast je nutno pro tato stanovení využívat zdroje emitující záření o požadované specifické vlnové délce. Takovými zdroji mohou být výbojky s dutou katodou, případně bezelektrodové výbojky. Metodou AAS lze stanovit koncentraci přibližně 70 prvků v roztoku. Jedná se o komparativní metodu, kdy jsou signály vzorků srovnávány se signály roztoků standardů. Nevýhodu AAS představuje nespecifická absorpce pozadí, kterou způsobují nevypařené pevné částice či absorpce molekul některých solí uvolněných při atomizaci. V moderních přístrojích umožňujících analýzy pomocí AAS lze tuto pozitivní chybu odstranit pomocí sofistikovaných korekcí [91,92].

2.6 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Jedná se o pokročilou techniku kapalinové chromatografie využívající kolony se stacionární fází, která je tvořena částicemi o malé a definované velikosti homogenně vyplňující vnitřní prostor kolony. Díky této homogenitě a vysoké hustotě náplně disponují kolony velkým hydrodynamickým odporem. Zmíněný hydrodynamický odpor je nutno pro umožnění dostatečného a konstantního průtoku mobilní fáze kolonami překonat využitím výkonných čerpadel schopných generovat přetlak v řádech jednotek až desítek MPa. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, z anglického „**h**igh-**p**erformance **l**iquid **c**hromatography“) umožňuje velmi účinnou separaci jednotlivých chemických látek v jejich směsích a tím i jejich detekci. Tuto detekci lze využít také pro kvantitativní určení obsahu příslušné chemické látky ve vzorku. Standardně je využíváno fotometrických detektorů schopných detekovat látky vystupující z kolony na základě jejich absorbance při dané vlnové délce, případně lze využít detektor s diodovým polem, který je schopen detekovat změny absorbance v celém požadovaném rozsahu vlnových délek záření. Pro detekci eluce látek z kolony při HPLC lze také aplikovat fluorimetrický detektor, případně lze využít detektorů hmotnostních či elektrochemických [93]. Rozlišujeme pět základních mechanismů separace látek v technice HPLC souvisejících s typem použité stacionární fáze. (i) Adsorpce molekul vzorků na povrch pevných částic stacionární fáze se uplatňuje, pokud je stacionární fáze tvořena pevnými částicemi. (ii) Rozdělovací rovnováha ustanovující se mezi kapalnou stacionární fází a mobilní fází je separačním mechanismem při využití stacionární fáze jako

kapaliny vázané na povrchu pevného nosiče. (iii) Elektrostatické interakce způsobující chemisorpci vzorku na povrchu částic stacionární fáze se uplatňuje při využití částic s nabitými skupinami na jejich povrchu. Technika využívající selektivně tohoto mechanismu se nazývá iontově výměnná chromatografie. (iv) Rozdělení složek vzorku dle velikosti jejich molekul je umožněno při využití stacionárních fází s mikropóry či molekulovými síty. Technika, která využívá tento mechanismus, má specifický název gelová permeační chromatografie. Částice stacionární fáze obsahují ve své struktuře dutiny o rozměrech řádově odpovídajících rozměrům separovaných molekul. Menší částice mohou pronikat do těchto dutin a dochází tak ke zpoždění jejich eluce z kolony. (v) Specifická interakce molekul vzorku s částicemi stacionární fáze se uplatní jako mechanismus separace v případě navázání specifických skupin na povrch částic stacionární fáze. Tento mechanismus je využit také v rámci afinitní chromatografie [92].

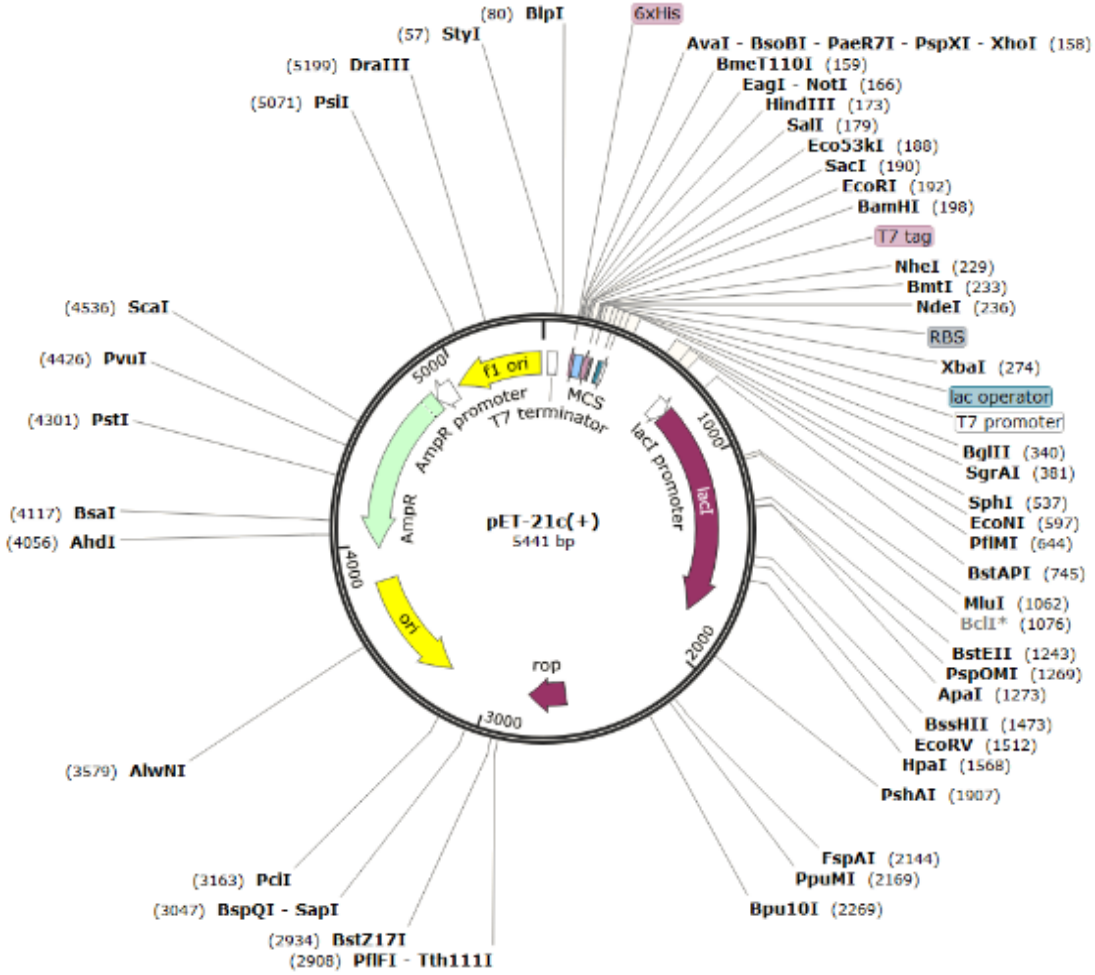
2.7 Metody molekulární biologie

V rámci této diplomové práce byl rekombinantně připraven protein Bach1 v prokaryotických expresních systémech *E. coli*. Pro tuto expresi byl využit plasmid pET-21c(+). Zároveň byly zahájeny přípravy pro zavedení exprese Bach1 v eukaryotických expresních systémech na úrovni přípravy potřebných plasmidů (plasmidy pTW5 a pTW5Sec).

2.7.1 Plasmid pET-21c(+)

Plasmid pET-21c(+) byl použit pro prokaryotickou expresi proteinu Bach1 v buňkách *E. coli*. Důležitou komponentou plasmidu pET-21c(+) je gen zajišťující rezistenci (tímto plasmidem transformovaných buněk) vůči antibiotiku ampicilinu, což lze využít pro detekci buněk, jež disponují tímto plasmidem. T7 promotor představuje další významnou součást plasmidu. Tento promotor vykazuje vysokou afinitu a specifitu k T7 RNA polymerase, pro kterou je typická mnohem vyšší efektivita ve srovnání s konvenčními bakteriálními RNA polymerasami. Exprese proteinu Bach1 byla provedena v buňkách *E. coli* BL-21 (DE3), které mají do DNA vložen gen pro T7 RNA polymerasu, jehož transkripce je regulována prostřednictvím *lac* operonu. Pro indukci transkripce zmíněného genu a následné exprese T7 RNA polymerasy je třeba přítomnost induktoru, například isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG). T7 RNA polymerasa následně interaguje s T7 promotorem vyskytujícím se v plasmidové DNA a umožňuje tak masivní transkripci genu vyskytujícího se bezprostředně za T7 promotorem a následnou masivní expresi příslušného proteinu, jenž daný gen kóduje. Oblast těsně za T7 promotorem je v plasmidu

pET21-c(+) tvořena sekvencí specifickou pro štěpení několika restrikčními endonukleasami [94]. Gen pro Bach1 byl do oblasti následující za T7 promotorem v rámci plasmidu pET-21c(+) vložen prostřednictvím restrikčních endonukleas *XhoI* a *NdeI*. Umístění genů pro daný protein do této oblasti umožní za specifických podmínek (přídavek IPTG a následná indukce exprese T7 RNA polymerasy) masivní transkripci daného genu a následnou expresi příslušného proteinu. Další výhodu představuje inkorporace afinitní značky v podobě histidinové kotvy na C-konec příslušného exprimovaného proteinu. Sekvenci plasmidu pET-21c(+) s vyznačením významných komponent znázorňuje schematicky obrázek 6 [95]. Tento plasmid byl poskytnut spolupracující japonskou laboratoří profesora Kazuhiko Igarashiho a upraven v rámci předchozích studií [96].

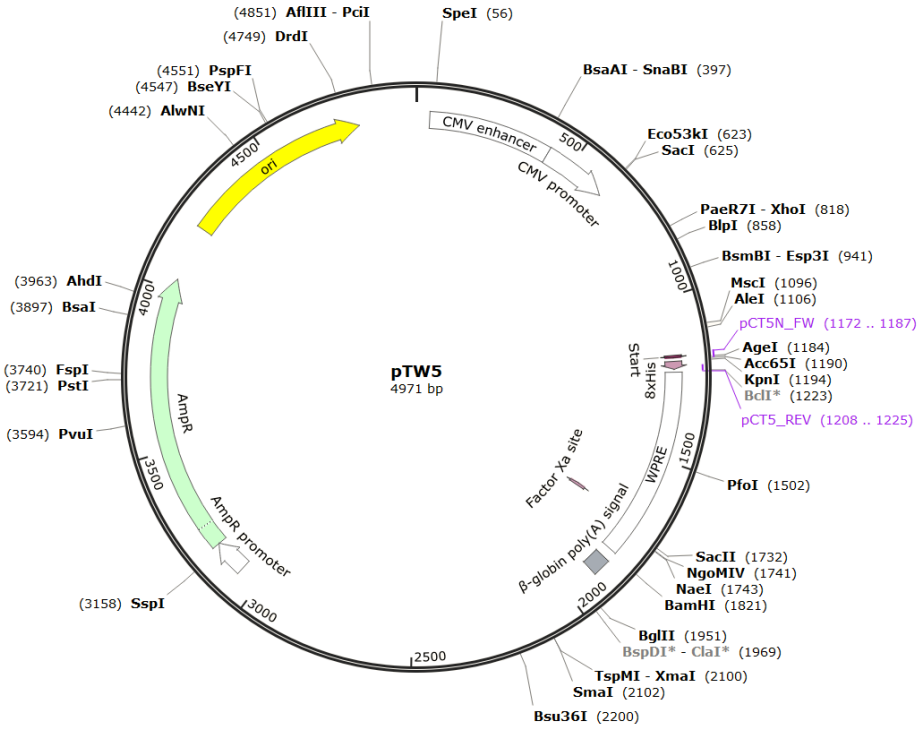


Obrázek 6 - Restrikční mapa plasmidu pET-21c(+). Převzato z [95].

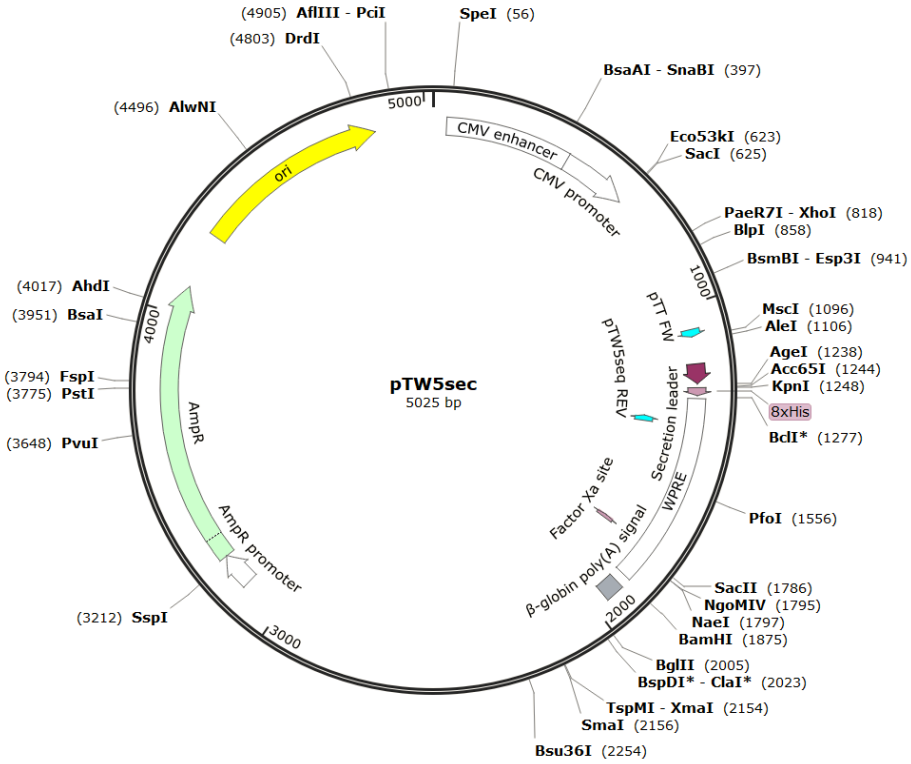
2.7.2 Plasmidy pTW5 a pTW5Sec

Plasmidy pTW5 a pTW5Sec jsou konstruovány pro expresi rekombinantních proteinů v systémech eukaryotických buněk. Oba rovněž disponují genem, který zajišťuje buňkám transformovaným danými plasmidy rezistenci vůči antibiotiku ampicilinu.

Funkce T7 promotoru je v těchto plasmidech nahrazena cytomegalovirovým promotorem, pro nějž jsou specifické RNA polymerasy konvenčně se vyskytující v eukaryotických buňkách. Gen pro exprimovaný protein lze vložit opět za oblast promotoru prostřednictvím restrikčních endonukleas. Protein Bach1 byl vložen do sekvence těchto plasmidů prostřednictvím restrikčních endonukleas *AgeI* a *KpnI*. Tyto plasmidy opět umožňují inkorporaci histidinové afinitní značky na C-konec příslušného exprimovaného proteinu. Plasmid pTW5Sec umožňuje díky specifické signální sekvenci sekreci exprimovaných proteinů z eukaryotických buněk do okolního media. Schematické znázornění sekvence plasmidů pTW5 a pTW5Sec je na obrázku 7, respektive na obrázku 8. Plasmidy pTW5 a pTW5Sec byly poskytnuty laboratoří RNDr. Ondřeje Vaňka, Ph.D.



Obrázek 7 - Restrikční mapa plasmidu pTW5. Plasmid byl připraven a obrázek v programu SnapGene byl vytvořen v rámci studie [97] vypracované v laboratoři RNDr. Ondřeje Vaňka, Ph.D.



Obrázek 8 - Restrikční mapa plasmidu pTW5Sec. Plasmid byl připraven a obrázek v programu SnapGene byl vytvořen v rámci studie [98] vypracované v laboratoři RNDr. Ondřeje Vaňka, Ph.D.

2.8 Analytická ultracentrifugace

Analytická ultracentrifugace (AUC) je metodou umožňující biofyzikální charakterizaci biomolekul včetně proteinů. Hydrodynamickou podstatou metody AUC je působení centrifugační odstředivé síly proti síle výtlačné a třecí. Toto vzájemné působení určuje rychlost sedimentace a případně i rovnovážnou polohu zkoumané částice. Pro jakýkoli systém tvořený zkoumanou částicí a rozpouštědlem lze definovat konstantu zvanou sedimentační koeficient, který udává Svedbergova rovnice (1):

$$S = \frac{v}{\omega^2.r} = \frac{m.(1-\bar{v}.\rho)}{f} = \frac{M.D.(1-\bar{v}.\rho)}{R.T}, \quad (1)$$

kde S je sedimentační koeficient, v je rychlost sedimentace částice, ω je úhlová rychlost rotoru, r je vzdálenost sedimentující částice od středu otáčení, $\bar{v}$ je parciální specifický objem sedimentující částice, ρ představuje hustotu rozpouštědla, f je frikční koeficient (jeho hodnotu ovlivňuje vnější tvar sedimentující částice), M je molární hmotnost sedimentující částice, D představuje difuzní koeficient, R univerzální plynovou konstantu a T absolutní teplotu. Sedimentační koeficient charakterizuje rychlost změny polohy sedimentačního

rozhraní v kyvetě během AUC experimentu. Jeho hodnota roste se zvyšující se molekulovou hmotností sedimentující částice. Vyšší hodnoty sedimentačního koeficientu vykazují částice sférického tvaru. Svedbergova rovnice představuje základní vztah umožňující určení sedimentačního koeficientu zkoumané částice pomocí AUC. Při znalosti rychlosti poklesu sedimentačního rozhraní lze vyřešit diferenciální rovnici charakterizující tuto rychlost a z řešení této rovnice odvodit hodnotu sedimentačního koeficientu. Polohu rozhraní lze detekovat díky kontinuálním optickým měřením zkoumaného vzorku s využitím kontinuálního stanovení absorbance při zvolené vlnové délce (pro proteiny typicky absorbance při 280 nm), případně lze využít interferenční optiku stanovující polohu rozhraní pomocí detekce gradientu indexu lomu [99].

Rozlišujeme dvě základní uspořádání AUC, metodu sedimentačních rychlostí a metodu sedimentační rovnováhy. Metoda sedimentačních rychlostí umožňuje určit hydrodynamické vlastnosti zkoumaných částic. Při této metodě je využito vysokých úhlových rychlostí a dochází tak k rychlé sedimentaci a tvorbě ostrého rozhraní v kyvetě, jehož poloha se postupně blíží dnu kyvety. Metodu sedimentačních rychlostí lze využít pro stanovení přibližné hodnoty molekulové hmotnosti zkoumaných částic, případně pro odhad tvaru částic při jejich známé molekulové hmotnosti. Metoda sedimentační rovnováhy, při níž je aplikována mnohem nižší úhlová rychlost, umožňuje určit především termodynamické vlastnosti zkoumaného vzorku. Nižší úhlová rychlost umožňuje po definovaném čase ustavení rovnováhy mezi sedimentací zkoumaných částic a jejich difuzí. Nedochází tedy k tvorbě ostrého rozhraní, ale ke vzniku postupného, monotónně vzrůstajícího gradientu koncentrace zkoumaných částic v kyvetě. Metodu sedimentačních rychlostí lze využít pro stanovení rovnovážné konstanty tvorby komplexu mezi biomolekulami [99].

3 Cíle diplomové práce

Pro předkládanou diplomovou práci byly stanoveny následující cíle:

- Provést expresi senzorového proteinu Bach1 v prokaryotickém expresním systému buněk *E. coli* BL-21(DE3). Následně provést izolaci a purifikaci rekombinantního proteinu Bach1 v jeho apoformě a holoformě.
- Optimalizovat expresi proteinu Bach1 v prokaryotickém expresním systému *E. coli* BL-21(DE3).
- Připravit plasmidovou DNA vhodnou pro expresi proteinu Bach1 v eukaryotických expresních systémech.
- Vhodnými metodami stanovit počet molekul heminu, které specificky interagují s proteinem Bach1.
- Zjistit, zda má přítomnost interakčních partnerů proteinu Bach1 vliv na jeho schopnost interagovat s molekulami heminu, konkrétně zda přítomnost těchto partnerů ovlivní počet molekul heminu, které specificky interagují s Bach1.
- Ověřit, zda interakce hemu s Bach1 indukuje strukturní změny tohoto proteinu a zda tato vazba ovlivňuje oligomerní stav proteinu Bach1.
- Zjistit, jestli má změna redoxního stavu iontu železa v hemu a jeho koordinačního stavu vliv na počet molekul hemu, které specificky interagují s Bach1.

4 Materiál a metody

4.1 Použité přístroje a zařízení

Analytická ultracentrifuga:	Beckman ProteomeLab XL-I - Beckman Coulter
Analytické váhy:	HM-200, A&D Instruments LTD
Atomový absorpční spektrometr:	ContrAA 700, Analytik Jena AG
Autokláv:	Microjet, Enbio Technology Panasonic MLS-37812
Bezdotykový kahan:	Gasprofi2 SCS, VLD-TEC
Centrifuga:	5415 R, Eppendorf 5415 D, Eppendorf Allegra X-30R, Beckman Coulter Gilson, GmC Lab Janetzki K 70 D, MLW
Čtečka 96-jamkových destiček:	Infinite M200 PRO, Tecan
Dialyzační patrona s membránou:	Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Devices Thermo Scientific™
Elektroforetická aparatura:	Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems, Bio Rad MSMINI 10-Multi Sub Mini, Uvitec
Inkubátor:	IR 1500 Automatic CO_2 Incubator, Flow Laboratories Mini Dry Bath, MD-MINI, Major Science Raven 2, LTE Scientific
Kolona pro gelovou chromatografii:	Superdex 200 Increase 10/300 GL
Kolona pro HPLC:	Luna® 5 µm C18(2) 100 Å, LC Column 150 x 4.6 mm, Ea
Laminární box:	BIO 126, Labox
Magnetická míchačka:	KMO2 basic, IKA
Orbitální třepač:	Infors HT Multitron Pro Scientific Incu-Shaker Shaking Incubator ES-60

Předvážky:	Kern 440-35N
Přístroj pro gelovou chromatografii:	ÄKTAprime plus - GE Healthcare
Přístroj pro HPLC:	Agilent 1200 Series
Spektrofotometr:	Cary 60 UV-VIS, Agilent technologies DS-11 Spectrophotometer, DeNovix
Sonikační lázeň:	ELMA E304 ELMASONIC
Termocykler:	Techne Tech Gene FTGENE2D
Termostat:	LS1, VLM Labortechnik
Transiluminátor:	Dark Reader, Clare Chemical Research
Třepačka:	Mini Rocker MR-1, BioSan Shaker SHO orbital motion, Witeg GERMANY ZX 3, Velp Scientifica
Ultracentrifuga:	Beckman Optima™ LE-80K
Ultrazvuková sonda:	Sonopuls HD 3100, sonda KE 76, Bandelin
Zdroj pro elektroforézu:	EPS 301, Electrophoresis Power Supply, Amersham Pharmacia Biotech

4.2 Použité chemikálie a materiál

Agilent Technologies, USA:	Pierce™ Microplate BCA Protein Assay Kit
Analytika, Praha:	ASTASOL®
Bio Tool, Švýcarsko:	Quick-Fusion Cloning Kit
Bio Rad, USA:	Precision Plus Protein^{TM} Standards
Clontech, USA:	TALON® Metal Affinity Resin
Dojindo Technologies, Japonsko:	sulfid sodný
Erba Lachema, ČR:	bromfenolová modř, chlorid sodný
Expedeon, Německo:	InstantBlue™ Protein Stain
Fluka, Švýcarsko:	akrylamid, dodecylsíran sodný (SDS), fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF), lysosym,

	2-merkaptoethanol, N,N´-methylen-bis-akrylamid (BIS), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)
INVITROGEN, USA:	SYBR SafeTM DNA Gel Stain
LACHEMA BRNO, ČR:	dihydrogenfosforečnan draselný, ethanol, ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), peroxodisíran amonný
Lach-Ner, ČR:	glycerol, octová kyselina
Linde, ČR:	dusík
NEW ENGLAND BioLabs, USA:	2-log DNA Ladder, *AgeI, BamHI*, CutSmart pufr, gel loading dye (6x koncentrovaný), *HindIII, KpnI,* Monarch® DNA Gel Extraction Kit, *NdeI,* NEB4 pufr, Phusion® High-Fidelity DNA Polymerasa, pufr Phusion® GC, *XhoI*
OXOID LTD, Velká Británie:	tryptone, yeast extract
Penta, ČR:	dithioničitan sodný, glycin, hydrogenfosforečnan draselný, hydroxid sodný, chlorid draselný, chlorid hořečnatý
Pharmacia, Švédsko:	agarosa
QIAGEN, Německo:	QIAprep Spin Miniprep Kit
SERVA Elektrophoresis, Německo:	ampicilin, Coomassie Brilliant Blue R-250, N,N,N´,N´-tetramethylethylendiamin (TEMED),
SIGMA, USA:	betain monohydrát, dimethylsulfoxid (DMSO), GTP, hemin, isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG), Luria Agar, Luria Broth, „forward a reverse primery“, pyridin, sorbitol, tetrabutyl amonium hydrogen sulfát
Stratagen, USA:	bakteriální kmeny DH5α a BL-21(DE3) bakterie *E. coli*

Protein MafK-MBP byl připraven RNDr. Alžbětou Lengálovou v rámci její disertační práce. Proteiny YddV-MBP WT a YddV-MBP Y43A byly připraveny Mgr. Veronikou Proškovou (dříve Fojtíkovou), Ph.D. v rámci její disertační práce. Plasmidy pTW5 a pTW5Sec byly laskavě poskytnuty laboratoří RNDr. Ondřeje Vaňka, Ph.D.

Plasmid pET-21c(+)/Bach1-Histag byl poskytnut spolupracující japonskou laboratoří profesora Kazuhiko Igarashiho a upraven v rámci předchozí studie [96].

Sekvence tzv. „primerů“ (krátkých syntetických oligonukleotidů komplementárních k vybrané sekvenci) použitých během zpracování diplomové práce:

- Sekvence „primerů“ použitých pro sekvenaci genu pro Bach1 vloženého ve vektoru pTW5, respektive ve vektoru pTW5Sec:

  5′-CCACTTTGCCTTTCTCTCCA-3′
  5′-GCTGTGCAGATTTACACGTG-3′
  5′-GGAGCAACATAGTTAAGAATACCAG-3′

- Sekvence „forward primeru“ pro amplifikaci genu pro Bach1 pomocí PCR a jeho následné začlenění do vektoru pTW5:

  5′-CACCATGGGAACCGGTATGTCTGTGAGTGAGAGTG-3′

- Sekvence „reverse primeru“ pro amplifikaci genu pro Bach1 pomocí PCR a jeho následné začlenění do vektoru pTW5:

  5′-TGGTGGTGATGGTGGGTACCCTCGTCAGTAGTGCACTTG-3′

- Sekvence „forward primeru“ pro amplifikaci genu pro Bach1 pomocí PCR a jeho následné začlenění do vektoru pTW5Sec:

  5′-TCTTGGAATTACCGGTATGTCTGTGAGTGAGAGTG-3′

- Sekvence „reverse primeru“ pro amplifikaci genu pro Bach1 pomocí PCR a jeho následné začlenění do vektoru pTW5Sec:

  5′-TGGTGGTGATGGTGGGTACCCTCGTCAGTAGTGCACTTG-3′

- Sekvence „forward primeru“ pro amplifikaci MARE úseků pomocí PCR:

  5′-GGAGGTACCGAGCTCTTAC-3′

- Sekvence „reverse primeru“ pro amplifikaci MARE úseků pomocí PCR:

  5′-GCAGTGCTCTGCCTTTTATG-3′

4.3 Metody molekulární biologie

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

Ve všech experimentech prováděných v rámci této práce byly využity speciálně upravené kompetentní buňky *E. coli* DH5α a *E. coli* BL-21(DE3), které pro transformaci příslušným plasmidem nevyžadují teplotní šok. Jedná se o tzv. vysoce účinnou transformaci buněk plasmidovou DNA. Pro tuto úpravu se v laboratoři doc. RNDr. Markéty Martínkové, Ph.D. využívá ZymoBroth médium a souprava Mix and Go od firmy Zymo Research (příprava speciálně upravených kompetentních buněk nebyla v rámci diplomové práce provedena, tyto buňky byly poskytnuty Mgr. Veronikou Proškovou, Ph.D.).

Pro veškeré dále popsané experimenty byl použit roztok LB média o koncentraci 25 $g.l^{-1}$ a roztok LB agaru o koncentraci 40 $g.l^{-1}$. Roztoky byly před použitím sterilizovány působením teploty 121 °C (Microjet, Enbio Technology) po dobu 10 minut.

Připravený sterilní LB agar byl rozpuštěn zahříváním v mikrovlnné troubě a ponechán mírně zchladnout. V laminárním boxu (BIO 126, Labox) bylo odlito do sterilní zkumavky Falcon požadované množství agaru dle počtu připravovaných agarových ploten (na přípravu 1 plotny bylo použito vždy cca 10 ml roztoku LB agaru). Do odebraného množství agaru bylo přidáno takové množství zásobního roztoku ampicilinu (koncentrace zásobního roztoku ampicilinu 100 $mg.ml^{-1}$), aby byla výsledná koncentrace ampicilinu v agaru 100 $\mu g.ml^{-1}$. Takto připravený roztok byl rovnoměrně rozdělen do sterilních Petriho misek. Po rozprostření agaru krouživými pohyby s Petriho miskami byly připravené agarové plotny ponechány ztuhnout při laboratorní teplotě.

Buňky *E. coli* byly ponechány rozmrznout na ledu. Do každé ze dvou sterilních mikrozkumavek Eppendorf bylo v laminárním boxu (BIO 126, Labox) přeneseno vždy 30 µl buněk *E. coli*. Do jedné z těchto mikrozkumavek bylo přidáno 0,5 µl plasmidové DNA, druhá mikrozkumavka představovala kontrolu. Obě mikrozkumavky byly ponechány 15 minut stát na ledu. K obsahu jednotlivých mikrozkumavek bylo přidáno 150 µl LB média. Poté byl obsah mikrozkumavek aplikován na příslušné agarové plotny (s obsahem ampicilinu 100 $\mu g.ml^{-1}$) a rovnoměrně rozprostřen po jejich povrchu. Takto připravené plotny s aplikovanými buněčnými suspenzemi byly ponechány inkubovat (Raven 2, LTE Scientific) při teplotě 37 °C po dobu 16 hodin. Po uplynutí příslušné doby byly plotny přeneseny do lednice, dokud nedošlo k jejich dalšímu zpracování.

V laminárním boxu (BIO 126, Labox) bylo do požadovaného počtu sterilních zkumavek Falcon přeneseno vždy 5 ml LB média a 5 µl zásobního roztoku ampicilinu (výsledná koncentrace 100 $\mu g.ml^{-1}$) a obsah zkumavek byl promíchán. Vybrané kolonie z transformovaných buněk *E. coli* připravené v předchozím kroku byly přeneseny do připravených zkumavek Falcon pomocí plamenem sterilizované pinzety a sterilních dřevěných tyčinek. Takto připravený obsah zkumavek byl inkubován v orbitálním třepači (Scientific Incu-Shaker Shaking Incubator ES-60) při teplotě 37 °C a 220 RPM po dobu 17 hodin. Následně byly vyjmuty dřevěné tyčinky ze zkumavek pomocí v plamenu sterilizované pinzety.

4.3.2 Izolace plasmidové DNA

Pro izolaci amplifikované plasmidové DNA byla využita souprava QIAprep Spin Miniprep Kit. Inkubace buněk *E. coli* DH5α transformovaných příslušnou plasmidovou DNA (viz kapitola 4.3.1) byla ukončena centrifugací (Allegra X-30R, Beckman Coulter) při teplotě 4 °C a 4 500 RPM po dobu 10 minut. Ze zkumavek Falcon byl po centrifugaci odstraněn supernatant. Pelety byly resuspendovány v 250 µl pufru P1 ze soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit. Vzniklá suspenze byla přenesena do mikrozkumavky Eppendorf. K této suspenzi bylo přidáno 250 µl pufru P2 ze soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit a mikrozkumavka byla šestkrát převrácena. Poté byl obsah mikrozkumavky ponechán tři minuty stát. Následně bylo do mikrozkumavky přidáno 350 µl pufru N3 ze soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit a mikrozkumavka byla desetkrát převrácena. Poté byla provedena centrifugace při laboratorní teplotě po dobu 10 minut při 16 100 *g* (5415 R, Eppendorf). Získaný supernatant byl přenesen na afinitní nosič mikrozkumavky, která byla součástí používané soupravy pro izolaci plasmidové DNA. Poté byla provedena centrifugace po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě a 16 100 *g* (5415 R, Eppendorf). Filtrát byl odstraněn a na afinitní nosič v mikrozkumavce bylo aplikováno 750 µl promývacího pufru PE ze soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit a opět byla provedena centrifugace při stejných parametrech. Po odstranění filtrátu byla centrifugace zopakována. Následně byl afinitní nosič přenesen do nové mikrozkumavky Eppendorf. Na afinitní nosič bylo aplikováno 50 µl elučního pufru EB ze soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit a bylo vyčkáno 1 minutu. Nakonec byla provedena centrifugace po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě a 16 100 *g* (5415 R, Eppendorf). Afinitní nosič byl odstraněn a v získaném roztoku byla stanovena koncentrace plasmidové DNA spektrofotometricky (DS-11 Spectrophotometer, DeNovix,

viz kapitola 4.5.1). Připravený roztok plasmidové DNA byl poté skladován před dalším použitím při teplotě -20 °C.

4.3.3 Příprava plasmidů pTW5/Bach1-Histag a pTW5sec/Bach1-Histag

V prvním kroku byl štěpen plasmid pTW5, respektive pTW5Sec, laskavě poskytnutý laboratoří RNDr. Ondřeje Vaňka, Ph.D., pro získání linearizovaného vektoru. Do tenkostěnné mikrozkumavky Eppendorf bylo přeneseno 7,0 µl sterilní deionizované vody; 2,0 µl CutSmart pufru (složení chráněno obchodním tajemstvím); 0,5 µl endonukleasy *AgeI-HF*; 0,5 µl endonukleasy *KpnI-HF* a 10 µl vektoru pTW5, respektive pTW5Sec o koncentraci 140 $\mu g.ml^{-1}$. Výsledná směs byla inkubována při teplotě 37 °C po dobu 3 hodin (inkubátor IR 1500 Automatic CO_2 Incubator, Flow Laboratories).

Byly navrženy „reverse a forward primery“ pro amplifikaci genu pro Bach1 pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR) a jeho následné začlenění do vektoru pTW5, respektive pTW5Sec s využitím tzv. spojovací klonovací reakce (sekvence „primerů“ - viz kapitola 4.2). Do tenkostěnné mikrozkumavky Eppendorf bylo přeneseno 32,5 µl sterilní deionizované vody; 10 µl pufru 5x Phusion® HF; 2,5 µl „forward primeru“ o koncentraci 10 $\mu mol.l^{-1}$; 2,5 µl „reverse primeru“ o koncentraci 10 $\mu mol.l^{-1}$; 1,0 µl směsi deoxynukleotidtrifosfátů (dNTP, koncentrace každého dNTP 10 $mmol.l^{-1}$); 1,0 µl desetkrát zředěného roztoku vektoru pET21c(+)/Bach1-Histag (koncentrace DNA v tomto zředěném roztoku 18,5 $\mu g.ml^{-1}$) v případě přípravy pTW5/Bach1-Histag, respektive 1,0 µl dvacetkrát zředěného roztoku vektoru pET21c(+)/Bach1-Histag (koncentrace DNA v tomto zředěném roztoku 9,3 $\mu g.ml^{-1}$) v případě přípravy pTW5Sec/Bach1-Histag a 0,5 µl Phusion® High-Fidelity DNA Polymerasy. Po promíchání obsahu byla mikrozkumavka s touto směsí umístěna do termocykleru (Techne Tech Gene FTGENE2D). PCR byla provedena s parametry uvedenými v tabulce 1. Paralelně byla stejným postupem provedena (v případě přípravy pTW5/Bach1-Histag i pTW5Sec/Bach1-Histag) PCR s přídavkem 1,0 µl stokrát zředěného roztoku vektoru pET-21c(+)/Bach1-Histag (koncentrace DNA v tomto zředěném roztoku 1,85 $\mu g.ml^{-1}$).

Tabulka 1 - Parametry použité pro PCR provedenou dle kapitoly 4.3.3.

Krok	Teplota (°C)	Čas (s)
Počáteční denaturace	98	60
35 cyklů o třech krocích s uvedenými parametry	98	10
	58	20
	72	70
Závěrečný krok	72	480
Stabilizace	4	-

Pro separaci požadovaného linearizovaného vektoru a produktu PCR byla využita agarosová elektroforéza (viz kapitola 4.4.1). Bylo pro ni použito 20 µl připraveného linearizovaného vektoru pTW5, respektive pTW5Sec, s přídavkem 4 µl 6× koncentrovaného vzorkového pufru (roztok 40% sacharosy s 91% bromfenolovou modří) a 25 µl PCR produktu smíchaného s 5 µl vzorkového pufru (viz kapitola 4.4.1). Porovnáním se standardem (2-log Ladder standard, viz kapitola 4.4.1) byly pomocí transiluminátoru (Dark Reader, Clare Chemical Research) identifikovány požadované pruhy separované DNA odpovídající linearizovanému vektoru pTW5, respektive pTW5Sec, a genu pro Bach1. Tyto pruhy byly vyříznuty skalpelem a umístěny do předem zvážených mikrozkumavek Eppendorf. Následně byla stanovena hmotnost příslušných agarových pruhů (HM-200, A&D Instruments LTD).

Pro izolaci DNA z agarosových pruhů byla využita souprava Monarch® DNA Gel Extraction Kit. Do mikrozkumavky Eppendorf s agarosovým pruhem byl přidán Monarch® Gel Dissolving Buffer (400 µl pufru na 100 mg agarosového pruhu). Obsah mikrozkumavek byl inkubován při teplotě 50 °C (LS1, VLM Labortechnik) za občasného protřepání (ZX 3, Velp Scientifica). Po rozpuštění agarosového gelu byl vzniklý roztok přenesen na afinitní nosič v mikrozkumavce ze soupravy Monarch® DNA Gel Extraction Kit a následně byla provedena centrifugace po dobu 1 minuty při 16 100 *g* (5415 R, Eppendorf). Po odstranění filtrátu z mikrozkumavky bylo na afinitní nosič přeneseno 200 µl Monarch® DNA Wash Buffer a centrifugace byla zopakována při stejných parametrech. Celý tento proces aplikace Monarch® DNA Wash Buffer byl ještě jednou zopakován. Poté byl afinitní nosič vložen do čisté mikrozkumavky Eppendorf. Na afinitní nosič bylo přidáno 8 µl Monarch® DNA Elution Buffer a bylo vyčkáno 1 minutu. Následně byla provedena

centrifugace po dobu 1 minuty při 16 100 *g* (5415 R, Eppendorf) a v získaném eluátu byla spektrofotometricky stanovena koncentrace DNA (DS-11 Spectrophotometer, DeNovix, viz kapitola 4.5.1).

Dále byla provedena tzv. spojovací klonovací reakce (z anglického názvu „Fusion Cloning Reaction“, souprava Quick-Fusion Cloning Kit). Do mikrozkumavky Eppendorf bylo aplikováno takové množství získaného roztoku linearizovaného vektoru, které odpovídá 50,3 ng plasmidové DNA v případě pTW5, respektive 49,7 ng plasmidové DNA v případě pTW5Sec. Dále bylo do stejné mikrozkumavky přidáno takové množství získaného roztoku DNA obsahující gen, jenž kóduje syntézu Bach1 („insert“), které odpovídá 44 ng DNA. Následně bylo do téže mikrozkumavky přidáno 0,2 µl Fusion Enzyme a 2,0 µl 5 × Fusion Buffer. Obsah mikrozkumavky byl inkubován po dobu 40 minut při teplotě 37 °C (IR 1500 Automatic CO_2 Incubator, Flow Laboratories). Následně byla provedena amplifikace takto získané plasmidové DNA. Pro transformaci buněk *E. coli* DH5α bylo použito 10 µl získané plasmidové DNA (viz kapitola 4.3.1 a 4.3.2). Po amplifikaci byla provedena sekvenace připravené plasmidové DNA (viz kapitola 4.3.4).

4.3.4 Sekvenace genu pro Bach1 vloženého ve vektorech pTW5/Bach1-Histag a pTW5Sec/Bach1-Histag

Sekvenace byly provedeny externě Laboratoří sekvenace DNA PřF UK, Biocev, Průmyslová 595, Vestec, 252 50. Výsledky byly zpracovány s využitím programu Seq Scanner 2.

Pro sekvenaci genu pro Bach1 vloženého ve vektorech pTW5 a pTW5Sec bylo potřeba navrhnout a objednat „primery“ (viz kapitola 4.2).

Vzorky pro sekvenaci obsahovaly vždy 300 ng plasmidové DNA v celkovém objemu 8 µl. „Primery“ byly přidány v množství 5 pmol.

4.3.5 Příprava DNA obsahující MARE úseky

Pro přípravu DNA obsahující MARE úseky byl využit plasmid pRBGP2 zaslaný spolupracující japonskou laboratoří profesora Igarashiho. Tento plasmid obsahuje vložený triplet sekvence odpovídající MARE úseku. Amplifikací této DNA sekvence pomocí PCR lze tedy připravit linearizovanou DNA obsahující MARE úseky.

Do tenkostěnné mikrozkumavky Eppendorf bylo přeneseno 97,5 µl sterilní deionizované vody; 30 µl pufru 5x Phusion® HF; 7,5 µl „forward primeru“ o koncentraci

10 μmol.l^{-1}; 7,5 μl „reverse primeru“ o koncentraci 10 μmol.l^{-1}; 3,0 μl směsi dNTP (koncentrace každého dNTP 10 mmol.l^{-1}); 3,0 μl stokrát zředěného roztoku plasmidové DNA (koncentrace DNA v tomto zředěném roztoku 5,6 μg.ml^{-1}) a 1,5 μl Phusion® High-Fidelity DNA Polymerasy. Po promíchání obsahu byla mikrozkumavka s touto směsí umístěna do termocykleru (Techne Tech Gene FTGENE2D). PCR byla provedena s parametry uvedenými v tabulce 2.

Tabulka 2 - Parametry použité pro PCR provedenou dle kapitoly 4.3.5.

Krok	Teplota (°C)	Čas (s)
Počáteční denaturace	98	60
35 cyklů o třech krocích s uvedenými parametry	98	10
	59,8	20
	72	10
Závěrečný krok	72	480
Stabilizace	4	-

Získaný produkt byl analyzován pomocí agarosové elektroforézy, čímž byla ověřena jeho identita a čistota (vzorek připraven z 25 μl PCR produktu smíchaného s 5 μl vzorkového pufru - viz kapitola 4.4.1).

4.3.6 Prokaryotická exprese proteinu Bach1

Exprese proteinu Bach1 byla provedena v TB médiu. Jedná se o vodný roztok obsahující 12 g.l^{-1} Bacto Yeast Extract; 24 g.l^{-1} Bacto Tryptone; 0,017 mol.l^{-1} dihydrogefosforečnanu draselného; 0,072 mol.l^{-1} hydrogenfosforečnanu draselného a 0,04% (*v/v*) glycerolu. Nejprve bylo připraveno požadované množství roztoku Bacto Yeast Extract a Bacto Tryptone o koncentracích 13,3 g.l^{-1}; respektive 26,7 g.l^{-1}. Tento roztok byl rozdělen po 450 ml do Erlenmayerových lahví. Hrdla těchto lahví byla překryta alobalem a jejich obsah byl sterilizován (Panasonic MLS-37812) při teplotě 120 °C po dobu 20 minut. Dále byl připraven roztok 0,17 mol.l^{-1} dihydrogenfosforečnanu draselného; 0,72 mol.l^{-1} hydrogenfosforečnanu draselného a 0,4% glycerolu (*v/v*). Připravený roztok byl přefiltrován přes filtrační papír a následně byl tento roztok sterilizován (Panasonic MLS-37812) při teplotě 120 °C po dobu 20 minut. Po vychladnutí bylo do každé

Erlenmayerovy láhve se sterilním roztokem Bacto Yeast Extract a Bacto Tryptone přidáno 50 ml připraveného sterilního roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného, hydrogenfosforečnanu draselného a glycerolu, čímž bylo připraveno TB médium.

Buňky *E. coli* BL-21(DE3) byly transformovány 0,5 µl plasmidové DNA (plasmid pET-21c(+)/Bach1-Histag) získané postupem popsaným v kapitole 4.3.2. Transformace, následná selekce transformovaných buněk *E. coli* BL-21(DE3) a příprava jednobuněčné kolonie takto transformovaných buněk byly provedeny postupem popsaným v kapitole 4.3.1.

Do každé Erlenmayerovy láhve se sterilním TB médiem bylo přidáno 0,5 ml ampicilinu (koncentrace zásobního roztoku 100 $mg.ml^{-1}$). Dále byla provedena inokulace pomocí 0,5 ml suspenze transformovaných buněk *E. coli* BL-21(DE3). Obsah Erlenmayerových lahví byl ponechán inkubovat v orbitálním třepači (Infors HT Multitron Pro) při 150 RPM a teplotě 37 °C, dokud se hodnota optické denzity buněk *E. coli* BL-21(DE3), OD_{600}, nenacházela mezi hodnotami 0,6 až 1,2 (optická denzita měřena spektrofotometrem DS-11 Spectrophotometer, DeNovix, metoda OD600). Po dosažení požadované hodnoty optické denzity byla snížena teplota inkubace na 15 °C. Následně byl odebrán vzorek pro analýzu pomocí SDS elektroforézy. Poté bylo do každé Erlenmayerovy láhve přidáno 0,1 ml IPTG (koncentrace zásobního roztoku 0,5 $mol.l^{-1}$) a obsah lahví byl ponechán inkubovat v orbitálním třepači (Infors HT Multitron Pro) při 120 RPM a teplotě 15 °C po dobu 17 hodin. Po uplynutí uvedené doby byl odebrán vzorek pro analýzu pomocí SDS elektroforézy. Exprese proteinu Bach1 byla ukončena centrifugací (Janetzki K 70 D, MLW) buněk při 4 °C a 3 000 RPM po dobu 45 minut. Byla zjištěna hmotnost získaných buněk (HM-200, A&D Instruments LTD) a tyto buňky byly uchovány při teplotě -80 °C pro pozdější využití.

4.3.7 Izolace apoformy a holoformy proteinu Bach1 z buněk *E. coli* BL-21(DE3)

Buňky obsahující protein Bach1, které byly získány postupem popsaným v kapitole 4.3.6, byly rozmraženy a následně resuspendovány v resuspendačním pufru (50 $mmol.l^{-1}$ Tris-HCl, pH 8,0; 100 $mmol.l^{-1}$ NaCl; 1 $mmol.l^{-1}$ EDTA; 1$mmol.l^{-1}$ PMSF; 0,2 $mg.ml^{-1}$ lysosym; na 5 g buněk použito asi 32 ml resuspendačního pufru). Následně byla za stálého míchání a chlazení na ledu provedena celkem šestkrát ultrazvuková sonikace buněk po dobu 1 minuty při amplitudě 50 % (Sonopuls HD 3100, sonda KE 76, Bandelin). Mezi jednotlivými kroky sonikace byly ponechány jednominutové pauzy.

V případě izolace holoformy proteinu Bach1 byl do vzniklé směsi přidán roztok heminu v DMSO do výsledné koncentrace heminu 300 $\mu mol.l^{-1}$. Tato směs byla ponechána

za stálého míchání (Mini Rocker MR-1, BioSan) inkubovat po dobu 20 minut při teplotě 4 °C. V případě izolace apoformy Bach1 byl tento krok vynechán.

Lyzované buňky byly dále podrobeny ultracentrifugaci po dobu 1 hodiny při teplotě 4 °C a 55 000 RPM (Beckman Optima™ LE-80K). Ze získaného supernatantu byly odebrány vzorky pro analýzu prostřednictvím SDS elektroforézy.

Pro izolaci proteinu Bach1 z cytosolární frakce buněk byla využita afinitní chromatografie. Afinitní nosič o objemu 2 ml (TALON® Metal Affinity Resin) byl ekvilibrován ekvilibračním pufrem (50 $mmol.l^{-1}$ Tris-HCl, pH 8,0; 100 $mmol.l^{-1}$ NaCl) pomocí centrifugace (Allegra X-30R, Beckman Coulter) při teplotě 4 °C a 200 RPM po dobu 2 minut (použito třikrát 5 ml uvedeného pufru). Takto ekvilibrovaný nosič byl ponechán inkubovat za stálého míchání (Mini Rocker MR-1, BioSan) po dobu 1 hodiny při teplotě 4 °C se supernatantem získaným předchozí ultracentrifugací. Následně byla směs převedena na chromatografické kolony s fritou. Zde byly směsi promyty 45 ml ekvilibračního pufru. Poté byla provedena eluce 15 ml elučního pufru (50 $mmol.l^{-1}$ TRIS, pH 8,0; 100 $mmol.l^{-1}$ NaCl; 200 $mmol.l^{-1}$ imidazol). Eluáty byly zachyceny do zkumavek a byl z nich odebrán vzorek pro analýzu pomocí SDS elektroforézy. K získanému eluátu byl přidán 2-merkaptoethanol do výsledné koncentrace 5 $mmol.l^{-1}$. Následovala inkubace eluátu s 2-markaptoethanolem za stálého míchání (KMO2 basic, IKA) po dobu 1 hodiny při 4 °C. Poté byly eluáty přeneseny do speciálních kyvet Amicon určených k „zakoncentrování“ vzorků proteinů a byla provedena centrifugace při teplotě 4 °C a 4 000 RPM po dobu 2 minut (Allegra X-30R, Beckman Coulter). Centrifugace byla při stejných parametrech opakována, dokud nebylo získáno asi 500 µl roztoku proteinu.

Protein v získaném roztoku byl dále purifikován pomocí gelové permeační chromatografie (ÄKTAprime plus - GE Healthcare, kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL - pro kalibraci kolony byly využity proteiny thyroglobulin (669 kDa, elační objem 8,6 ml), apoferritin (481 kDa, elační objem 9,5 ml), aldolasa (158 kDa, elační objem 12,1 ml), BSA (66 kDa, elační objem 13,2 ml) a ovalbumin (43 kDa, elační objem 14,4 ml)). Jako mobilní fáze byl použit pufr o složení 20 $mmol.l^{-1}$ Tris, pH 8,0 a 150 $mmol.l^{-1}$ NaCl. U všech frakcí byla sledována absorbance při 280 nm. Byly odebrány frakce obsahující izolovaný protein Bach1. Odebrané frakce byly spojeny a vzniklý roztok byl „zakoncentrován“ centrifugací při teplotě 4 °C a 4 000 RPM pomocí speciálních kyvet Amicon na objem asi 250 µl (Allegra X-30R, Beckman Coulter). V získaném supernatantu obsahujícím finální preparát proteinu Bach1 byla stanovena koncentrace izolovaného proteinu Bach1 (viz kapitola 4.5.1) a byl z něj odebrán vzorek pro analýzu pomocí SDS elektroforézy. Finální

preparát proteinu Bach1 byl rozdělen do alikvotů o objemu 30 µl. Tyto alikvoty byly zmraženy v tekutém dusíku a uchovány při teplotě -80 °C.

4.3.8 Optimalizace prokaryotické exprese proteinu Bach1

Ve snaze optimalizovat prokaryotickou expresi a následnou izolaci proteinu Bach1 byla otestována exprese proteinu Bach1 za různého složení média, ve kterém byly buňky *E. coli* BL-21(DE3) kultivovány. Byl ověřen účinek monohydrátu betainu o koncentraci 34 $mg.l^{-1}$, respektive sorbitolu o koncentraci 182 $g.l^{-1}$ v expresním médiu na míru exprese tohoto proteinu. Buňky *E. coli* BL-21(DE3) byly transformovány 0,5 µl plasmidové DNA (plasmid pET-21c(+)/Bach1-Histag) získané postupem popsaným v kapitole 4.3.2. Transformace, následná selekce transformovaných buněk *E. coli* BL-21(DE3) a příprava jednobuněčné kolonie takto transformovaných buněk byly provedeny postupem popsaným v kapitole 4.3.1. Následně bylo připraveno 100 ml expresního média o složení dle tabulky 3. Roztok Bacto Yeast Extract (13,3 $g.l^{-1}$) a Bacto Tryptone (26,7 $g.l^{-1}$), respektive LB média (27,8 $g.l^{-1}$) s případným přídavkem 34 $mg.l^{-1}$ monohydrátu betainu byl připraven o uvedených koncentracích složek a následně sterilizován (Panasonic MLS-37812) při teplotě 120 °C po dobu 20 minut. Dále byly připraveny roztoky o koncentraci 0,17 $mol.l^{-1}$ dihydrogenfosforečnanu draselného; 0,72 $mol.l^{-1}$ hydrogenfosforečnanu draselného, případně také 0,4% glycerolu (*v/v*) glycerolu a 202 $g.l^{-1}$ sorbitolu. Tyto připravené roztoky byly vždy přefiltrovány přes filtrační papír a následně byly sterilizovány (Panasonic MLS-37812) při teplotě 120 °C po dobu 20 minut. Následně byly příslušné dvojice sterilizovaných roztoků spojeny do konečného objemu 100 ml pro získání koncentrací jednotlivých složek uvedených v tabulce 3.

Tabulka 3 - Složení jednotlivých expresních médií použitých v rámci optimalizace prokaryotické exprese a izolace proteinu Bach1. Symbol „X“ značí, že příslušné médium obsahovalo tuto složku v uvedené koncentraci. Kombinace s využitím Bacto Yeast Extractu, Bacto Tryptonu a glycerolu (vše o koncentracích uvedených tabulce) je v této práci označována jako TB médium.

Číslo láhve	Bacto Yeast Extract (12 $g.l^{-1}$) + Bacto Tryptone (24 $g.l^{-1}$)	LB médium (25 $g.l^{-1}$)	Glycerol (0,04 % *v/v*)	Sorbitol (182 $g.l^{-1}$)	Betain monohydrát (34 $mg.l^{-1}$)
1	X		X		
2	X		X	X	X
3	X		X		X
4	X			X	X
5		X		X	X
6		X			X

V takto připravených médiích byla provedena prokaryotická exprese proteinu Bach1 dle kapitoly 4.3.6, pouze s odlišným přídavkem suspenze buněk *E. coli* BL-21(DE3) (100 µl) a zásobního roztoku ampicilinu (100 µl zásobního roztoku, výsledná koncentrace ampicilinu 100 $\mu g.ml^{-1}$) a následně zásobního roztoku IPTG (20 µl zásobního roztoku IPTG, výsledná koncentrace IPTG 0,1 $mmol.l^{-1}$). Poté byla zahájena izolace Bach1 z příslušných buněk dle kapitoly 4.3.7 až do fáze ultracentrifugace, kdy byl experiment ukončen. Během experimentu byly odebrány a následně analyzovány pomocí SDS elektroforézy následující vzorky: buňky *E. coli* BL-21(DE3) před indukcí IPTG, buňky *E. coli* BL-21(DE3) po indukci IPTG, supernatant a peleta získané ultracentrifugací (viz kapitola 4.4.2).

4.4 Elektroforetické metody

4.4.1 Horizontální agarosová elektroforéza

K navážce 0,4 g agarosy (Kern 440-35N) bylo přidáno 40 ml TAE pufru (0,04 $mol.l^{-1}$ Tris-acetát; pH 8,2; 1 $mmol.l^{-1}$ EDTA) a byla stanovena hmotnost této směsi. Pro rozpuštění agarosy byl využit ohřev v mikrovlnné troubě za pravidelného promíchávání. Po rozpuštění agarosy byl roztok doplněn na původní hmotnost deionizovanou vodou. Po mírném ochlazení byly k roztoku přidány 4,0 µl barviva SYBR SAFETM DNA gel Stain. Roztok byl promíchán a přenesen do vaničky pro provádění elektroforézy. Byly vytvořeny vzorkové jamky a směs byla ponechána stát po dobu 30 minut. Vzniklý gel byl přenesen

do elektroforetické aparatury (MSMINI 10-Multi Sub Mini, Uvitec). Tato aparatura byla naplněna TAE pufrem.

Do jamek byla přenesena směs 20 µl vzorku v případě linearizovaného vektoru pTW5 či pTW5Sec se 4 µl 6× koncentrovaného vzorkového pufru (roztok 40% sacharosy s 91% bromfenolovou modří). V případě analýzy PCR produktu bylo do vzorkových jamek přeneseno 30 µl vzorku PCR produktu (směs 25 µl PCR produktu a 5,0 µl vzorkového pufru). Standardu 2-log Ladder bylo aplikováno 6,0 µl na jamku (1,0 µl 2-log DNA Ladder; 1,0 µl gel loading dye; 4,0 µl deionizované vody). Elektroforéza byla prováděna 30 minut při napětí 110 V. Po skončení elektroforézy byl agarosový gel přenesen na lihem očištěný povrch transiluminátoru (Dark Reader, Clare Chemical Research) pro zviditelnění separované DNA.

4.4.2 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS-PAGE)

Nejprve byla sestavena aparatura pro SDS elektroforézu se dvěma skly (Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems, Bio Rad). Roztok pro vznik separačního gelu (10% *w/v*) byl připraven smícháním 6,7 ml pufru A (0,375 mol.l^{-1} Tris-HCl; 0,1% SDS (*w/v*), pH 8,8); 3,3 ml polymeračního roztoku A (30% *w/v* akrylamid; 0,8% *w/v* BIS v pufru A); 10 µl TEMEDu a 100 µl peroxodisíranu amonného (koncentrace zásobního roztoku 100 mg.ml^{-1}). Po promíchání byl připravený roztok pro vznik separačního gelu přenesen mezi dvě skla umístěná vertikálně v aparatuře pro elektroforézu. Nanesený roztok pro vznik separačního gelu byl převrstven deionizovanou vodou. Po uplynutí 30 minut byla nanesená voda odstraněna. Následně byl připraven roztok pro vznik zaostřovacího gelu (4% *w/v*) smícháním 2,6 ml pufru B (0,125 mol.l^{-1} Tris-HCl; 0,1% *w/v* SDS, pH 6,8; 0,0006% bromfenolová modř); 400 µl polymeračního roztoku B (30% *w/v* akrylamid; 0,8% *w/v* BIS v pufru B); 3,0 µl TEMED a 60 µl peroxodisíranu amonného (koncentrace zásobního roztoku 100 mg.ml^{-1}). Vzniklá směs byla po promíchání nanesena na vrstvu separačního gelu a byly v ní vytvořeny vzorkové jamky. Poté byla aparatura přenesena do elektroforetické vany. Vzniklý prostor mezi dvojicemi skel i elektroforetická vana byly naplněny elektrodovým pufrem (0,025 mol.l^{-1} Tris-HCl; 0,192 mol.l^{-1} glycin; 0,1% *w/v* SDS, pH 8,3). Vzorky odebrané během předchozích experimentů byly smíchány se vzorkovým redukujícím pufrem (čtyřikrát koncentrovaným obsahujícím 0,25 mol.l^{-1} Tris-HCl; 8% *w/v* SDS; 40% *v/v* glycerol; 20% *v/v* 2-merkaptoethanol; 0,012% *w/v* bromfenolovou modř, pH 6,8) a deionizovanou vodou (viz tabulka 4). Takto upravené vzorky byly inkubovány při teplotě 100 °C po dobu 5 minut v inkubátoru (Mini Dry Bath, MD-MINI,

Major Science) a poté krátce odstředěny pomocí stolní minicentrifugy (Gilson, GmC Lab). Vzorky a standard (Precision Plus Protein™ Standards) byly aplikovány do vzorkových jamek. Elektroforéza probíhala po dobu 1 hodiny při napětí 200 V (EPS 301, Electrophoresis Power Supply, Amersham Pharmacia Biotech). Po skončení elektroforézy byl separační gel přenesen do Petriho misky obsahující barvicí lázeň (InstantBlue™ Protein Stain). Barvení separačního gelu probíhalo za stálého třepání (Shaker SHO orbital motion, Witeg GERMANY) po dobu 60 minut. Po uplynutí této doby byl obarvený separační gel umístěn do Petriho misky s deionizovanou vodou a za stálého míchání v ní ponechán přes noc. Následně byl pořízen obrazový záznam tohoto gelu.

Tabulka 4 - Příprava vzorků pro SDS elektroforézu.

Typ vzorku	Objem odebraného vzorku (µl)	Objem deionizované vody (µl)	Objem vzorkového pufru (µl)
Buňky před indukcí IPTG	15,00	0	5,00
Buňky po indukci IPTG	15,00	0	5,00
Supernatant po ultracentrifugaci	5,00	10,00	5,00
Peleta po ultracentrifugaci	neurčeno	3,75	1,25
Eluát v elučním pufru po afinitní chromatografii	15,00	0	5,00
Eluát v elučním pufru po redukci pomocí 2-merkaptoethanolu	15,00	0	5,00
Finální preparát proteinu Bach1 (po „zakoncentrování“)	0,50	8,50	3,00
	1,00	5,00	2,00

4.5 Spektrofotometrické metody

4.5.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace plasmidové DNA a proteinu v roztoku

Pro stanovení koncentrace plasmidové DNA v roztoku byla využita metoda „dsDNA“ v mikroobjemu (DS-11 Spectrophotometer, DeNovix). Jako „blank“ byla použita deionizovaná voda. Na detekční plochu spektrofotometru byly aplikovány 2,0 µl „blanku“ (tedy deionizované vody). Po odstranění „blanku“ byly na detekční plochu spektrofotometru přeneseny 2,0 µl roztoku plasmidové DNA. Koncentrace plasmidové DNA v roztoku byla určena spektrofotometerem (DS-11 Spectrophotometer, DeNovix) na základě měření absorbance při 260 nm dle vztahu (2):

$$c = \frac{A_{260} \cdot \mathrm{CF}}{l}, \tag{2}$$

v němž c je koncentrace plasmidové DNA v roztoku v jednotkách ng.µl^{-1}, A_{260} je absorbance při 260 nm, CF je přepočítávací faktor v jednotkách ng.cm.µl^{-1} (pro dvouřetězcovou DNA byla výrobcem stanovena hodnota tohoto faktoru CF = 50 ng.cm.µl^{-1}) a l je tloušťka absorpčního prostředí v jednotkách cm.

Pro stanovení koncentrace proteinu v roztoku byla použita souprava Pierce™ Microplate BCA Protein Assay Kit. Jako „blank“ byla použita deionizovaná voda. Standardem byl hovězí sérový albumin (BSA) o různých koncentracích. Stanovení bylo provedeno s využitím mikrotitrační 96-jamkové destičky. Pracovní reagent byl připraven smícháním reagentu A (hydrogenuhličitan sodný, uhličitan sodný, bicinchoninová kyselina (BCA), vinan sodný v 0,1 mol.l^{-1} hydroxidu sodném, koncentrace složek chráněna obchodním tajemstvím) a reagentu B (4% síran měďnatý) v poměru 50:1 (v uvedeném pořadí). Do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky bylo aplikováno vždy 9,0 µl blanku (deionizovaná voda), standardů (BSA o koncentracích 4 mg.ml^{-1}, 8 mg.ml^{-1}, 16 mg.ml^{-1}, 24 mg.ml^{-1}, 32 mg.ml^{-1}, 48 mg.ml^{-1} a 64 mg.ml^{-1} postupně do jednotlivých jamek) a vzorku finálního preparátu proteinu Bach1 a následně 260 µl pracovního reagentu. Následovala inkubace při teplotě 37 °C po dobu 30 minut. Pomocí čtečky destiček (Infinite M200 PRO, Tecan) byly změřeny absorbance roztoků v jednotlivých jamkách při 562 nm. Na základě hodnot absorbancí standardů o známé koncentraci BSA byla sestavena kalibrační přímka. S využitím této kalibrační přímky byla následně odečtena koncentrace finálního preparátu proteinu Bach1. Každé stanovení bylo provedeno třikrát.

4.5.2 Stanovení celkového obsahu molekul hemu v roztoku

Pro toto stanovení byl využit princip detekce volných molekul hemu na základě jeho tvorby komplexu s pyridinem popsaný v kapitole 2.5.2. Do mikrozkumavky Eppendorf bylo přeneseno 420 µl proteinového preparátu o koncentraci 6 µmol.l^{-1}. Následně bylo k tomuto preparátu přidáno 100 µl pyridinu a roztok byl promíchán (ZX 3, Velp Scientifica). Poté bylo k roztoku přidáno 50 µl hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol.l^{-1} a roztok byl opět promíchán (ZX 3, Velp Scientifica). Takto připravený roztok o koncentraci proteinového preparátu 5 µmol.l^{-1} byl přenesen do kyvety z křemenného skla a bylo získáno absorpční spektrum této směsi v oblasti 200 nm až 700 nm (Cary 60 UV-VIS, Agilent technologies), které bylo využito jako základní linie. Následně byl do kyvety přidán čerstvě připravený zásobní roztok dithioničitanu sodného (koncentrace zásobního roztoku 1,2 mol.l^{-1}), tak aby byla koncentrace dithioničitanu sodného v roztoku v kyvetě 10 mmol.l^{-1}. Po promíchání bylo opět zaznamenáno absorpční spektrum. Ze získaného absorpčního spektra byl určen rozdíl hodnot absorbancí při 557 nm a při 541 nm (ΔA). Při znalosti tloušťky absorpčního prostředí (l = 1 cm) a rozdílu hodnot molárního absorpčního koeficientu při 557 nm a 541 nm ($\Delta\varepsilon$ = 20,7 dm^3.mmol^{-1}.cm^{-1}) byla určena koncentrace hemu v analyzovaném vzorku (c_{hem}) pomocí rovnice (3) vycházející z Lambertova-Beerova zákona:

$$c_{hem} = \frac{\Delta A}{\Delta\varepsilon \cdot l}\,. \tag{3}$$

Následně byl stanoven poměr koncentrace molekul hemu ku koncentraci příslušného proteinu. Tento postup byl nejprve ověřen s využitím roztoku myoglobinu a následně byl použit pro stanovení koncentrace molekul hemu v preparátu holoformy Bach1. Stanovení bylo pro každý preparát provedeno třikrát.

4.5.3 Spektrofotometrická titrace Bach1, MafK-MBP a DNA obsahující MARE úseky heminem

Nejprve byl připraven zásobní roztok heminu v DMSO o koncentraci 600 µmol.l^{-1}. Připravený roztok byl před použitím vždy třikrát sonikován v sonikační lázni (ELMA E304 ELMASONIC). Následně byl do křemenné kyvety aplikován roztok vzorku v pufru (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl) o koncentraci příslušné složky či složek určené dle tabulky 5 a bylo proměřeno absorpční spektrum těchto vzorků v oblasti 200 nm až 700 nm při teplotě 25 °C jako základní linie (Cary 60 UV-VIS, Agilent technologies). Následovalo 25 přídavků (respektive v případě směsi apoformy Bach1 s DNA obsahující MARE úseky 40 přídavků) zásobního roztoku heminu, přičemž každý přídavek heminu

představoval nárůst jeho koncentrace v roztoku v kyvetě o 1 μmol.l^{-1}. Po každém přídavku heminu byl roztok v kyvetě řádně promíchán a po uplynutí 1 minuty od přídavku bylo zaznamenáno absorpční spektrum v oblasti 200 nm až 700 nm (Cary 60 UV-VIS, Agilent technologies) při teplotě 25 °C. Popsaná spektrofotometrická titrace byla provedena pro samotný pufr (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl), pro směs 60 % pufru (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl) a 40 % DMSO a pro jednotlivé složky a jejich příslušné směsi dle tabulky 5. Protein MafK-MBP byl exprimován a izolován RNDr. Alžbětou Lengálovou. Všechny experimenty byly provedeny třikrát. Následně byla získaná spektra analyzována v programu Origin. Experimentální body získané vynesením závislosti absorbance titrovaného roztoku při specifické vlnové délce (pro Bach1 411 nm, pro DNA obsahující MARE úseky 392 nm) na přídavku heminu, respektive poměru koncentrace přidaného heminu ku koncentraci příslušné makromolekuly v titrovaném roztoku, byly proloženy regresními přímkami. V průsečíku těchto přímek byl odečten počet molekul hemu, které interagují s příslušnou makromolekulou (tzv. „bod ekvivalence“ – viz také kapitola 2.5.1). Vzhledem k tomu, že během těchto experimentů byly použity dva různé preparáty heminu a preparáty proteinu Bach1 a DNA připravené v odlišných datech, nebylo možno přímo porovnat jednotlivé křivky. Tyto křivky nicméně vykazovaly shodné směrnice svých lineárních úseků. Odchylky experimentálních bodů byly v případě nenalezení „bodu ekvivalence“ odhadnuty jako 10 %. V případě nalezení „bodu ekvivalence“ byly odchylky experimentálních bodů, s, vypočteny na základě stanovených výsledků dle vzorce:

$$s = \frac{0{,}591 \cdot R_{max-min}}{x} \cdot 100\ \%\,, \tag{4}$$

v němž $R_{max-min}$ je rozpětí souboru výsledků, tedy rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou v souboru, a x je medián souboru výsledků.

Tabulka 5 - Koncentrace jednotlivých složek, tedy Bach1, MafK-MBP a DNA obsahující MARE úseky při spektrofotometrické titraci heminem.

Typ vzorku	Koncentrace Bach1 v roztoku v kyvetě ($\mu mol.l^{-1}$)	Koncentrace MafK-MBP v roztoku v kyvetě ($\mu mol.l^{-1}$)	Koncentrace DNA v roztoku v kyvetě ($\mu mol.l^{-1}$)
apoforma či holoforma Bach1	5	-	-
MafK-MBP	-	5	-
DNA obsahující MARE úseky	-	-	0,7
apoforma Bach1 s DNA obsahující MARE úseky	5	-	0,7
MafK-MBP s DNA obsahující MARE úseky	-	5	0,7
apoforma Bach1 s MafK-MBP a s DNA obsahující MARE úseky	5	5	0,7

4.5.4 Reverzní titrace roztoku heminu apoformou Bach1

Nejprve byl připraven zásobní roztok heminu v DMSO o koncentraci 600 $\mu mol.l^{-1}$. Připravený roztok byl před použitím vždy třikrát sonikován v sonikační lázni (ELMA E304 ELMASONIC). Následně byl do křemenné kyvety aplikován roztok pufru (20 $mmol.l^{-1}$ Tris, pH 8,0 a 150 $mmol.l^{-1}$ NaCl) s heminem o koncentraci 5 $\mu mol.l^{-1}$ a bylo proměřeno spektrum tohoto roztoku v oblasti 200 nm až 700 nm při teplotě 25 °C jako základní linie (Cary 60 UV-VIS, Agilent technologies). Následovalo 20 přídavků apoformy Bach1, přičemž každý přídavek apoformy Bach1 představoval nárůst jeho koncentrace v roztoku v kyvetě o 0,5 $\mu mol.l^{-1}$. Po každém přídavku apoformy Bach1 byl roztok v kyvetě řádně promíchán

a po uplynutí 1 minuty od přídavku bylo zaznamenáno absorpční spektrum při 200 nm až 700 nm při teplotě 25 °C (Cary 60 UV-VIS, Agilent technologies). Tento experiment byl zopakován třikrát. Následně byla získaná spektra analyzována v programu Origin. Odchylky experimentálních bodů byly určeny postupem, který je popsán v kapitole 4.5.3.

4.5.5 Vliv jiných redoxních a ligandových stavů hemu na koordinační vlastnosti Bach1

Postup byl analogický jako v kapitole 4.5.4. Těsně před přípravou roztoku 5 μmol.l^{-1} heminu pro aplikaci do kyvety byl připraven zásobní roztok sulfidu sodného o koncentraci 100 mmol.l^{-1}, respektive zásobní roztok dithioničitanu sodného o koncentraci 1,2 mol.l^{-1}. Bezprostředně po přípravě roztoku heminu o koncentraci 5 μmol.l^{-1} byl do něj přidán zásobní roztok sulfidu sodného, respektive dithioničitanu sodného pro dosažení výsledné koncentrace sulfidu sodného 5 mmol.l^{-1}, respektive dithioničitanu sodného 10 mmol.l^{-1}. Následně byly provedeny přídavky apoformy Bach1, zaznamenána a zpracována absorpční spektra dle stejného postupu, jako je uvedeno v kapitole 4.5.4.

4.5.6 Atomová absorpční spektrometrie (AAS)

Metoda atomové absorpční spektrometrie byla využita pro stanovení celkového obsahu iontů železa v preparátech apoformy i holoformy proteinu Bach1 a také v preparátu apoformy Bach1 podrobeného spektrofotometrické titraci heminem po odstranění nespecificky vázaných molekul heminu gelovou permeační chromatografií (viz kapitola 4.3.7). Stanovení obsahu iontů železa pomocí AAS bylo provedeno také pro samotný pufr (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl) pro ověření jeho čistoty. Jak již bylo uvedeno výše, pro izolaci proteinu Bach1 z titrační směsi a pro odstranění nespecificky interagujících molekul heminu byla využita gelová permeační chromatografie (viz kapitola 4.3.7). Získané frakce proteinu Bach1 byly následně spojeny a roztok Bach1 byl „zakoncentrován“ na celkový objem cca 250 μl (viz kapitola 4.3.7). V získaném preparátu byla stanovena koncentrace proteinu Bach1 (viz kapitola 4.5.1) a následně v něm byl stanoven celkový obsah iontů železa pomocí AAS.

Stanovení celkového obsahu iontů železa v připravených preparátech bylo provedeno RNDr. Jakubem Hraníčkem, Ph.D. (katedra Analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova). Pro stanovení byl použit atomový absorpční spektrometr s kontinuálním zdrojem záření a s vysokým rozlišením ContrAA 700 (Analytik Jena AG). Kalibrace přístroje pro popsaná stanovení iontů železa ve vzorcích byla provedena pomocí kalibračního roztoku ASTASOL® (obsah železa 1,000 ± 0,005 g.l^{-1}; složení: 99,995% Fe v 2% kyselině dusičné). Požadované koncentrace železa byly získány ředěním popsaného roztoku deionizovanou

vodou. Vzorky byly analyzovány v režimu elektrotermické atomizace. Bylo nadávkováno vždy 20 µl vzorku spolu s 5 µl modifikátoru $Mg(NO_3)_2$. Teplotní program elektrotermické atomizace zahrnoval kroky shrnuté v tabulce 6. Každé stanovení bylo provedeno třikrát.

Tabulka 6 - Shrnutí jednotlivých kroků programu elektrotermické atomizace při stanovení koncentrace iontů železa ve vzorcích Bach1 pomocí AAS.

Krok	Název	Teplota (°C)	Nárůst teploty za sekundu ($°C.s^{-1}$)	Doba trvání kroku (s)
1	sušení	80	6	20
2	sušení	90	3	20
3	sušení	110	5	10
4	pyrolýza	350	50	20
5	pyrolýza	1100	300	10
6	adaptace plynu	1100	0	5
7	atomizace	2000	1500	4
8	čištění	2450	500	4

4.6 Chromatografické metody

4.6.1 Stanovení katalytické aktivity proteinu YddV-MBP WT a jeho mutantu Y43A v přítomnosti sulfidu sodného pomocí HPLC

Protein YddV-MBP WT (přirozeně se vyskytující forma proteinu, z anglického „**w**ild **t**ype“) a jeho mutant YddV-MBP Y43A byly připraveny Mgr. Veronikou Proškovou, Ph.D. v rámci její disertační práce. Roztok obsahující 10 $µmol.l^{-1}$ proteinu YddV-MBP WT; 50 $mmol.l^{-1}$ KCl; 5 $mmol.l^{-1}$ $MgCl_2$ a 50 $mmol.l^{-1}$ Tris, pH 8,0 byl ponechán inkubovat se sulfidem sodným o koncentraci 5 $mmol.l^{-1}$ (zásobní roztok sulfidu sodného o koncentraci 100 $mmol.l^{-1}$ byl připraven bezprostředně před přídavkem) po dobu 21,5 minut. V případě mutantu YddV-MBP Y43A byla provedena inkubace při stejných koncentracích jednotlivých složek po dobu 6 minut. Paralelně byla provedena také analýza vzorků YddV-MBP WT

a YddV-MBP Y43A bez inkubace v prostředí sulfidu sodného. Po inkubaci byl roztok rozdělen na devět částí po 100 µl. K jednotlivým částem bylo přidáno příslušné množství GTP, tak aby jeho koncentrace v daném vzorku byla 10 µmol.l^{-1}, 25 µmol.l^{-1}, 50 µmol.l^{-1}, 100 µmol.l^{-1}, 300 µmol.l^{-1}, 500 µmol.l^{-1}, 750 µmol.l^{-1} a 1000 µmol.l^{-1}. Jeden ze vzorků neobsahoval žádné GTP. Po přídavku GTP byl roztok ponechán inkubovat po dobu 2,5 minuty při teplotě 24 °C. Enzymová reakce byla následně ukončena inkubací při teplotě 100 °C po dobu 3 minut (Mini Dry Bath, MD-MINI, Major Science) a následnou centrifugací při 13 200 RPM po dobu 3 minut (5415 D, Eppendorf). Odebraný supernatant byl analyzován pomocí HPLC (Agilent 1200 Series, kolona Luna® 5 µm C18(2) 100 Å, LC Column 150 x 4.6 mm, Ea) s využitím pufru A (0,1 mol.l^{-1} dihydrogenfosforečnan draselný; 4 mmol.l^{-1} tetrabutyl amonium hydrogen sulfát, pH 6,0) a pufru B (75 % pufru A a 25 % methanolu) jako mobilní fáze. Při analýze byla použita průtoková rychlost mobilní fáze 0,7 ml.min^{-1} a gradientová eluce při složení mobilní fáze v čase 0 minut 60 % pufru A a 40 % pufru B, v čase 15 minut 100 % pufru B a v čase 21 minut 60 % pufru A a 40 % pufru B. Pro detekci analytů (GTP a c-di-GMP) bylo využito sledování hodnoty absorbance při 254 nm. Popsaná analýza byla pro každý vzorek provedena třikrát. Získaná data byla zpracována pomocí programů Instrument 1 a Origin.

4.7 Analytická ultracentrifugace proteinu Bach1

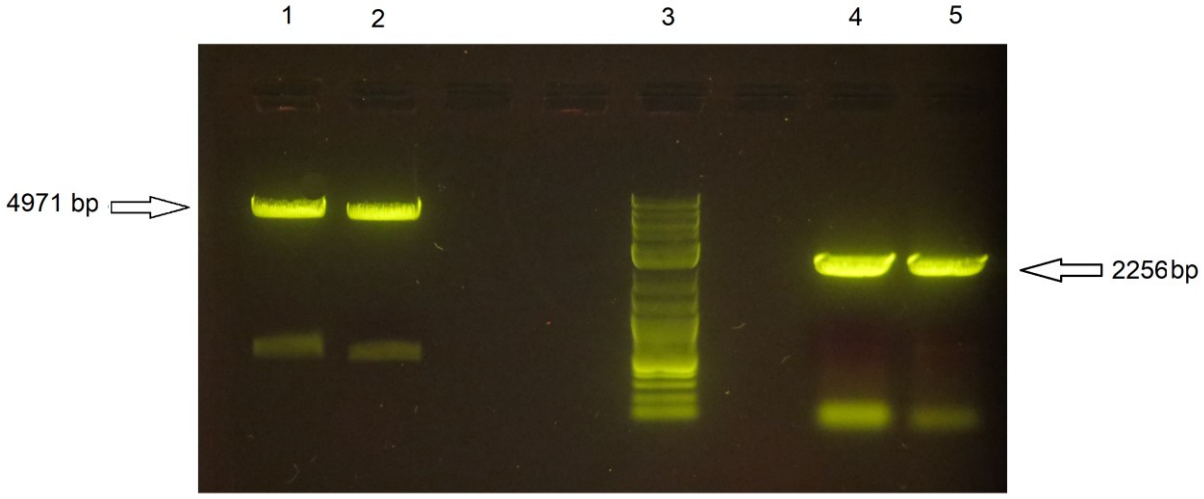
Tento experiment byl proveden za asistence doc. RNDr. Miroslava Šulce, Ph.D. (katedra Biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova). Nejprve byla provedena dialýza preparátů apoformy a holoformy Bach1 proti pufru obsahujícímu 20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl (Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Devices Thermo Scientific™). Následně byly z těchto dialyzovaných preparátů připraveny vzorky Bach1 o koncentraci proteinu 15 µmol.l^{-1} a 30 µmol.l^{-1} (DS-11 Spectrophotometer, DeNovix, pro ředění byl použit dialyzační pufr). Po složení kyvet určených pro analýzy pomocí analytické ultracentrifugace byly jednotlivé vzorky přeneseny do příslušných kyvet. Střední část těchto kyvet je rozdělena na dvě části – do jedné části bylo aplikováno 400 µl vzorku, druhá část byla naplněna 400 µl dialyzačního pufru, který představoval referenci. Následně byla provedena analýza vzorků pomocí analytické ultracentrifugace (Beckman ProteomeLab XL-I - Beckman Coulter) metodou sedimentačních rychlostí při otáčkách rotoru 42 000 RPM a teplotě 20 °C s detekcí absorbance vzorků při 280 nm (celkem provedeno pro každý vzorek 130 skenů s dvouminutovými prodlevami). Naměřená data byla zpracována pomocí programů Sedfit a Gussi. Hustota a viskozita použitého pufru a parciální specifický objem proteinu Bach1 byly

stanoveny pomocí programu SEDNTERP. Zpracovaná data poskytla hodnotu zdánlivé molekulové hmotnosti jednotlivých vzorků, díky které bylo možno určit oligomerní stav proteinu v roztoku. Ze získané distribuce hodnot sedimentačního koeficientu byla určena hodnota sedimentačního koeficientu, *S*, pro příslušné oligomerní stavy. Dále byla pomocí programu Sedfit určena hodnota sedimentačního koeficientu korigovaného na teplotu 20 °C a vodu jako rozpouštědlo, $S_{20,w}$.

5 Výsledky

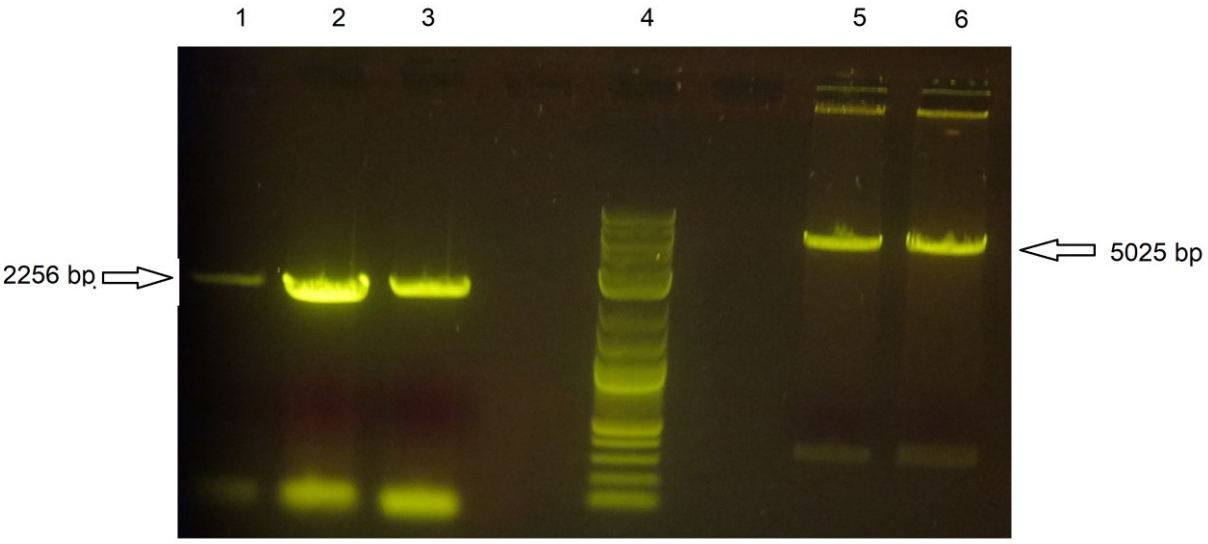
5.1 Příprava plasmidů pTW5/Bach1-Histag a pTW5Sec/Bach1-Histag

Vzhledem k plánovanému zavedení exprese proteinu Bach1 v eukaryotických expresních systémech byly připraveny vektory pTW5/Bach1-Histag a pTW5Sec/Bach1-Histag vhodné pro tuto expresi. Jako zdroj genu pro Bach1 byl při přípravě plasmidů pTW5/Bach1-Histag a pTW5Sec/Bach1-Histag použit vektor pET-21c(+)/Bach1-Histag. Vektory pTW5 a pTW5Sec s vloženým genem pro jiný protein byly laskavě poskytnuty laboratoří RNDr. Ondřeje Vaňka, Ph.D. Převedení genu kódujícího protein Bach1 do vektorů pTW5 a pTW5Sec a nahrazení příslušných genů pro jiné proteiny bylo provedeno dle kapitoly 4.3.3. Amplifikace genu pro Bach1 byla úspěšně provedena pomocí PCR (viz kapitola 4.3.3). Následně byla využita horizontální agarosová elektroforéza pro separaci linearizovaných vektorů a amplifikovaného genu pro Bach1 (viz kapitola 4.4.1). Snímky agarosového gelu s vyznačenými oblastmi, v nichž se nacházely amplifikovaný gen pro Bach1 (2 256 bp) a příslušné linearizované vektory pTW5 (4971 bp), respektive pTW5Sec (5025 bp) jsou na obrázku 9, respektive na obrázku 10.



Obrázek 9 - Separace linearizovaného vektoru pTW5 a amplifikovaného genu pro Bach1 pomocí horizontální agarosové elektroforézy.

Dráha 1 a 2: Vzorek linearizovaného vektoru pTW5; Dráha 3: standard 2-log Ladder; Dráha 4: vzorek genu pro Bach1 amplifikovaného pomocí PCR, pro PCR použit desetkrát zředěný roztok vektoru pET-21c(+)/Bach1-Histag; Dráha 5: vzorek genu pro Bach1 amplifikovaného pomocí PCR, pro PCR použit stokrát zředěný roztok vektoru pET-21c(+)/Bach1-Histag.



Obrázek 10 - Separace linearizovaného vektoru pTW5Sec a amplifikovaného genu pro Bach1 pomocí horizontální agarosové elektroforézy.

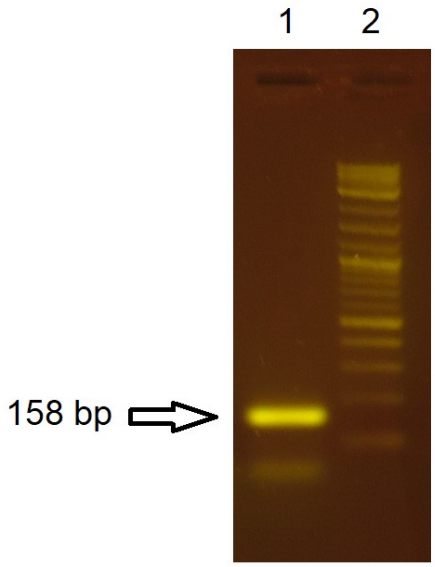
Dráha 1: vzorek genu pro Bach1 amplifikovaného pomocí PCR, pro PCR použit stokrát zředěný roztok vektoru pET-21c(+)/Bach1-Histag; Dráha 2 a 3: vzorek genu pro Bach1 amplifikovaného pomocí PCR, pro PCR použit dvacetkrát zředěný roztok vektoru pET-21c(+)/Bach1-Histag; Dráha 4: standard 2-log Ladder; Dráha 5 a 6: Vzorek linearizovaného vektoru pTW5Sec.

Vyznačené pruhy agarosy byly vyříznuty pomocí skalpelu a byla z nich izolována příslušná DNA (viz kapitola 4.3.3). Byl tak získán roztok obsahující amplifikovaný gen pro Bach1 o koncentraci 116 ng.μl^{-1} (poměr absorbance roztoku při 260 nm ku absorbanci při 280 nm měl hodnotu 1,99) a roztok obsahující linearizovaný vektor pTW5 o koncentraci 79 ng.μl^{-1} (poměr absorbance roztoku při 260 nm ku absorbanci při 280 nm měl hodnotu 1,88), respektive roztok obsahující linearizovaný vektor pTW5Sec o koncentraci 32 ng.μl^{-1} (poměr absorbance roztoku při 260 nm ku absorbanci při 280 nm měl hodnotu 1,96). Po provedení spojovací klonovací reakce (viz kapitola 4.3.3) byly připravenými vektory transformovány buňky *E. coli* DH5α (viz kapitola 4.3.1) pro následnou amplifikaci těchto vektorů. Tato amplifikace a následná izolace plasmidové DNA (viz kapitola 4.3.2) byla provedena úspěšně. Byl získán roztok plasmidové DNA pTW5/Bach1-Histag o koncentraci 730 ng.μl^{-1} (poměr absorbance roztoku při 260 nm ku absorbanci při 280 nm měl hodnotu 1,95) a roztok plasmidové DNA pTW5Sec/Bach1-Histag o koncentraci 690 ng.μl^{-1} (poměr absorbance roztoku při 260 nm ku absorbanci při 280 nm měl hodnotu 1,9). Následnou sekvenací genu pro Bach1 vloženého ve vektorech pTW5/Bach1-Histag

a pTW5Sec/Bach1-Histag (viz kapitola 4.3.4) bylo potvrzeno, že během manipulace s tímto genem v něm nevznikla žádná spontánní mutace.

5.2 Příprava DNA obsahující MARE úseky

Příprava DNA obsahující MARE úseky byla provedena pomocí PCR (viz kapitola 4.3.5). Jako zdroj výchozí DNA pro tuto PCR byl využit plasmid pRBGP2 zaslaný spolupracující japonskou laboratoří profesora Igarashiho. Získaný PCR produkt obsahující DNA s MARE úseky byl analyzován pomocí horizontální agarosové elektroforézy (viz kapitola 4.4.1). Snímek agarosového gelu s vyznačenou oblastí, v níž se nacházela příslušná DNA s MARE úseky je na obrázku 11. Koncentrace takto připraveného roztoku DNA byla 379 ng.µl^{-1} (poměr absorbance roztoku při 260 nm ku absorbanci při 280 nm měl hodnotu 1,40).



Obrázek 11 - Separace amplifikované DNA obsahující MARE úseky pomocí horizontální agarosové elektroforézy.

Dráha 1: vzorek DNA obsahující MARE úseky, která byla amplifikována pomocí PCR; Dráha 2: standard 2-log Ladder.

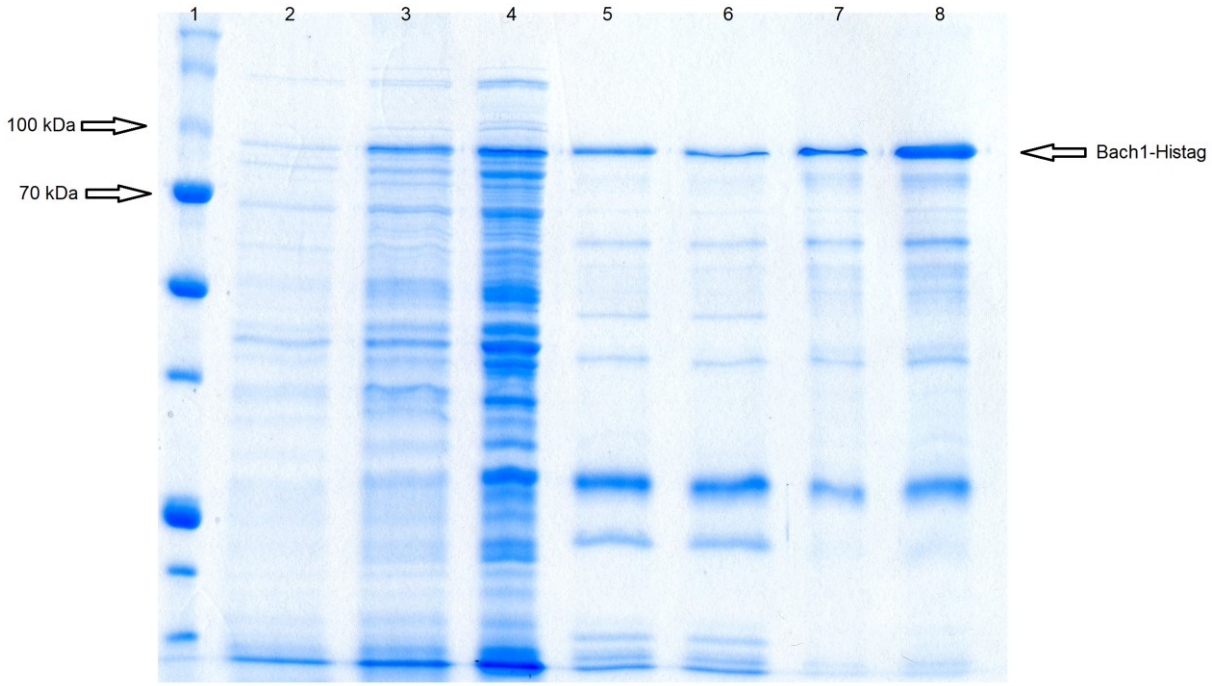
5.3 Prokaryotická exprese proteinů Bach1

Nejprve byla úspěšně provedena transformace buněk *E. coli* BL-21(DE3) plasmidem pET-21c(+)/Bach1-Histag (viz kapitola 4.3.1). Exprese proteinu Bach1 byla provedena dle postupu uvedeném v kapitole 4.3.6. Po 4 hodinách inkubace buněk v TB médiu dosáhla

optická denzita OD_{600} této směsi hodnoty 1,1. Hmotnost buněk získaných z 8 l TB média byla 53 g, což odpovídá výtěžku 13 g buněk z 1 l TB média. Během exprese proteinu Bach1 byly pro analýzu pomocí SDS elektroforézy odebrány vzorky buněk *E. coli* BL-21(DE3) před přídavkem IPTG a po přídavku IPTG (viz obrázek 12, dráhy 2 a 3). Vzorek buněk *E. coli* BL-21(DE3) před indukcí IPTG obsahuje proteiny s podobnou molekulovou hmotností jako protein Bach1, tj. 81 kDa, nicméně po indukci exprese rekombinantního proteinu Bach1 je množství proteinů s mobilitou odpovídající mobilitě proteinů o velikosti přibližně 81 kDa mnohem větší. Exprese proteinu Bach1 v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) tedy pravděpodobně proběhla úspěšně a bylo možno přistoupit k izolaci tohoto proteinu.

5.4 Izolace proteinu Bach1 v jeho apoformě a holoformě

Izolace exprimovaného proteinu Bach1 z buněk *E. coli* BL-21(DE3) v jeho apoformě a holoformě byla provedena dle postupu, který je popsán v kapitole 4.3.7. V průběhu izolace byly odebrány vzorky supernatantu získaného ultracentrifugací, eluátu v elučním pufru po afinitní chromatografii, eluátu v elučním pufru po redukci pomocí 2-merkaptoethanolu a finálního preparátu proteinu Bach1 v jeho apoformě a holoformě (po „zakoncentrování“) pro ověření identity izolovaného proteinu a odhad čistoty výsledného preparátu. Ukázkový snímek gelu získaného pomocí SDS elektroforézy obsahující vzorky z exprese a izolace proteinu Bach1 v jeho apoformě je na obrázku 12.



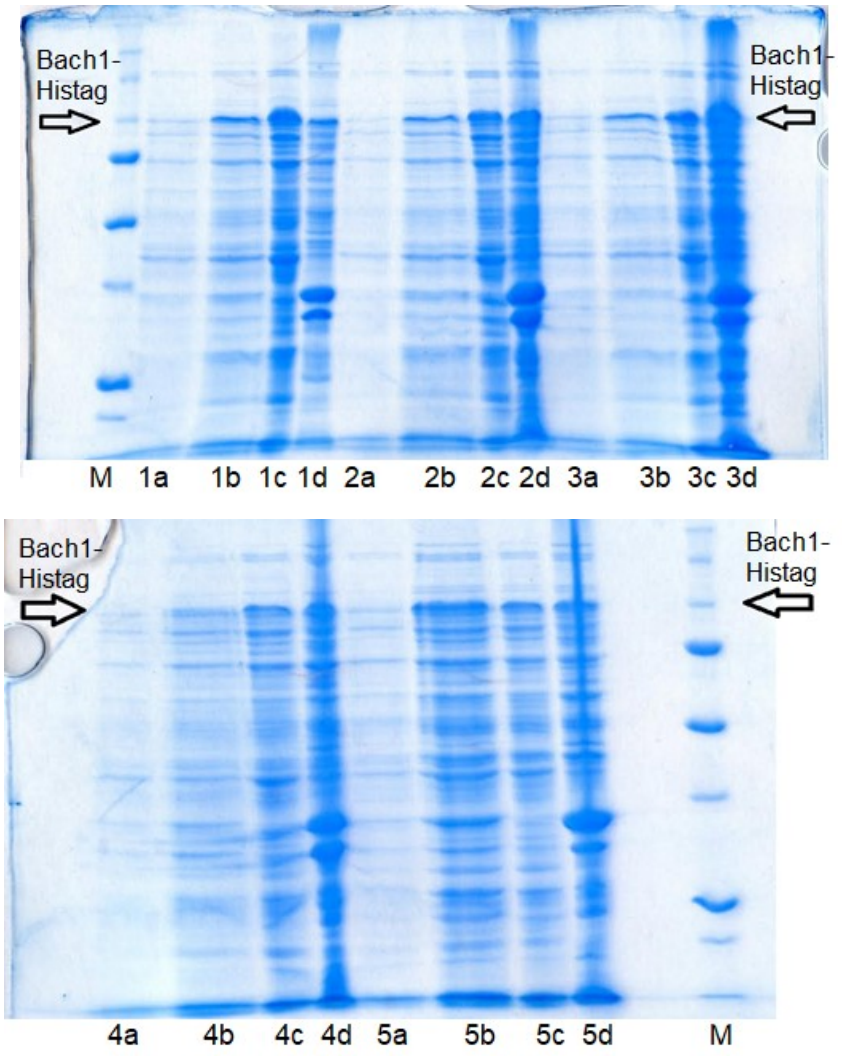
Obrázek 12 - Snímek gelu získaného SDS elektroforézou vzorků odebraných během exprese a izolace apoformy proteinu Bach1.

Dráha 1: standard Precision Plus Protein™ Standards; Dráha 2: buňky E. coli BL-21(DE3) před přídavkem IPTG; Dráha 3: buňky E. coli BL-21(DE3) po přídavku IPTG a indukci exprese proteinu Bach1; Dráha 4: supernatant získaný po ultracentrifugaci; Dráha 5: eluát v elučním pufru po afinitní chromatografii; Dráha 6: eluát v elučním pufru po redukci pomocí 2-merkaptoethanolu; Dráha 7: finální preparát apoformy Bach1 (pro přípravu vzorku použito 0,5 µl preparátu apoformy Bach1); Dráha 8: finální preparát apoformy Bach1 (pro přípravu vzorku použito 1,0 µl preparátu apoformy Bach1).

Postupem popsaným v kapitole 4.3.7 bylo získáno celkem 150 µl roztoku apoformy Bach1 o koncentraci 6,2 $mg.ml^{-1}$ a čistotě 80 %. Analogickým postupem bylo připraveno celkem 170 µl roztoku holoformy Bach1 o koncentraci 2,4 $mg.ml^{-1}$ a čistotě 75 %. V průběhu izolace připravené holoformy Bach1 byly odebrány stejné vzorky jako při izolaci apoformy Bach1. Tyto vzorky byly analyzovány SDS elektroforézou pro ověření úspěšnosti izolace holoformy Bach1 (data nejsou ukázána). Koncentrace finálních preparátů proteinu Bach1 byly stanoveny dle postupu popsaném v kapitole 4.5.1. Výsledky izolace odpovídají výtěžku 116 µg apoformy Bach1 z 1 l TB média a 51 µg holoformy Bach1 z 1 l TB média. Exprese a následná izolace Bach1 v jeho apoformě i holoformě byla v průběhu zpracování diplomové práce několikrát zopakována s podobnými výtěžky.

5.5 Optimalizace prokaryotické exprese proteinu Bach1

Vzhledem k relativně nízkému výtěžku proteinu Bach1, byla provedena optimalizace prokaryotické exprese proteinu Bach1. Optimalizace byla provedena dle postupu, který je popsán v kapitole 4.3.8. Byla otestována různá složení expresního média (viz kapitola 4.3.8, tabulka 3) s důrazem na ověření vlivu přítomnosti monohydrátu betainu a sorbitolu v expresním médiu na úroveň exprese proteinu Bach1. Během tohoto experimentu byly pro každé složení expresního média odebrány vzorky buněk *E. coli* BL-21(DE3) před indukcí pomocí IPTG a po indukci IPTG a dále vzorky pelety a supernatantu získané ultracentrifugací. Tyto vzorky byly analyzovány pomocí SDS elektroforézy. Snímky výsledných gelů odpovídající různým složením expresního média jsou znázorněny na obrázku 13. Analýza pomocí SDS elektroforézy byla provedena pro všechny varianty expresního média (viz kapitola 4.3.8, tabulka 3) s výjimkou expresního média obsahujícího Bacto Yeast Extract (12 $g.l^{-1}$), Bacto Tryptone (24 $g.l^{-1}$), sorbitol (182 $g.l^{-1}$) a betain monohydrát (34 $mg.l^{-1}$), neboť v médiu o tomto složení se nepodařilo kultivovat buňky *E. coli* BL-21(DE3).



Obrázek 13 - SDS elektroforéza vzorků odebraných během optimalizace prokaryotické exprese proteinu Bach1 (šipka značí oblast molekulové hmotnosti proteinů, která odpovídá proteinu Bach1-Histag, tj. 81 kDa):

M — standard Precision Plus Protein™ Standards
1 — exprese v TB médiu
2 — exprese v TB médiu s 182 g.l^{-1} sorbitolu a 34 mg.l^{-1} betainu monohydrátu
3 — exprese v TB médiu s 34 mg.l^{-1}betainu monohydrátu
4 – exprese v LB médiu s 182 g.l^{-1} sorbitolu a 34 mg.l^{-1}betainu monohydrátu
5 – exprese v LB médiu s 34 mg.l^{-1}betainu monohydrátu
a — buňky E. coli před indukcí IPTG
b — buňky E. coli po indukci IPTG
c — supernatant po ultracentrifugaci
d — peleta po ultracentrifugaci

Optimalizace exprese proteinu Bach1 v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) provedená dle kapitoly 4.3.8 neprokázala zvýšenou míru exprese proteinu Bach1 v přítomnosti sorbitolu či betainu monohydrátu. Největší míra exprese proteinu Bach1 byla pozorována v případě média

o složení, které bylo použito při expresi proteinu Bach1 dle kapitoly 4.3.6, tedy v případě TB média.

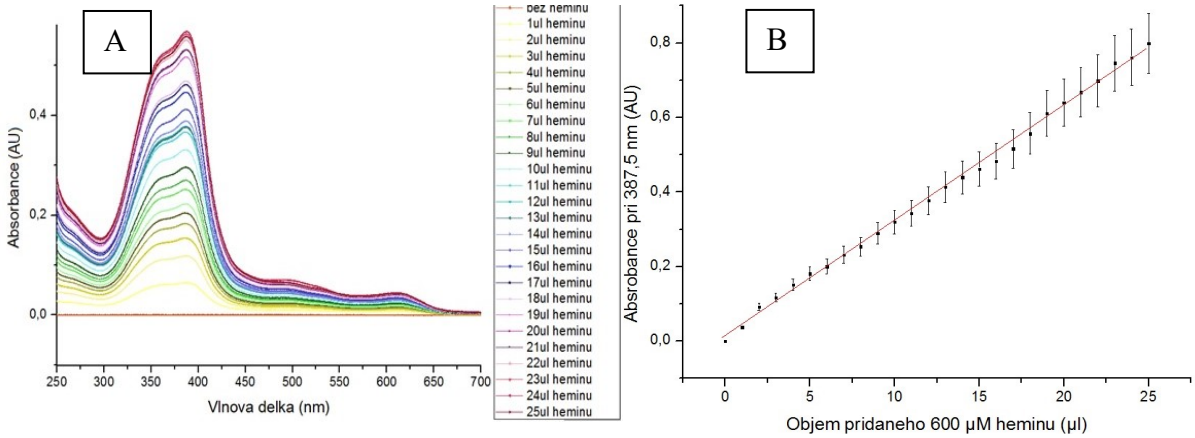
5.6 Celkový obsah molekul hemu v preparátu holoformy Bach1

Celkový obsah molekul hemu v preparátu holoformy Bach1 byl určen postupem popsaným v kapitole 4.5.2. Metoda byla nejprve ověřena pro roztok myoglobinu o výsledné koncentraci 5 $\mu mol.l^{-1}$. Stanovený poměr koncentrace molekul hemu ku koncentraci proteinu v preparátu myoglobinu byl 0,82 ± 0,27. Tato hodnota odpovídá interakci přibližně jedné molekuly hemu s jednou molekulou myoglobinu, což odpovídá realitě.

Stejný postup byl následně aplikován v případě holoformy proteinu Bach1. Stanovený poměr koncentrace molekul hemu ku koncentraci proteinu v preparátu holoformy Bach1 byl 1,52 ± 0,52. Tato hodnota odpovídá interakci přibližně jedné až dvou molekul hemu s jednou molekulou Bach1 v jeho holoformě. Pro zpřesnění výsledku bylo třeba volit další experimentální přístupy.

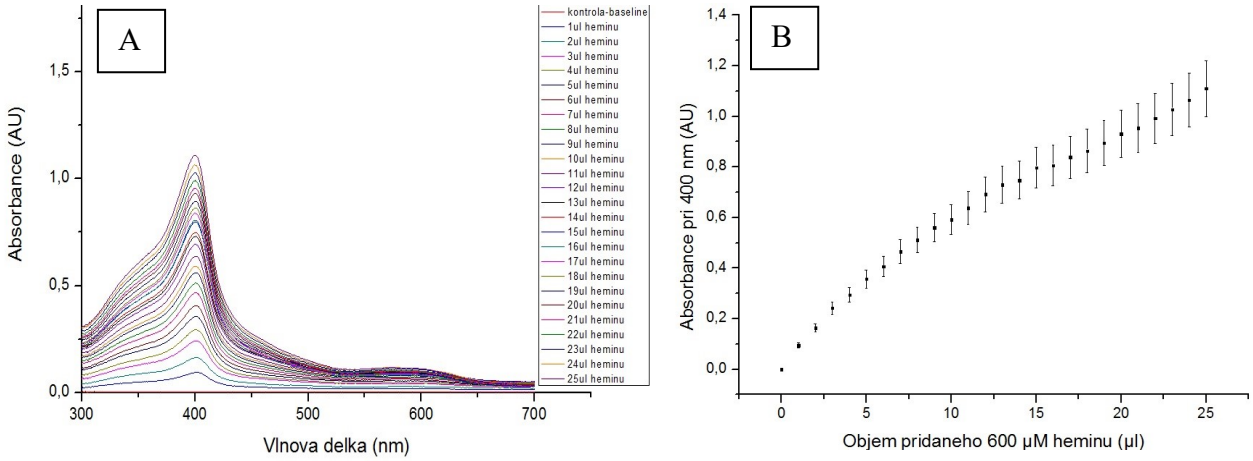
5.7 Spektrofotometrická titrace roztoku izolovaných makromolekul Bach1, MafK-MBP a DNA obsahující MARE úseky heminem

Nejprve byla provedena spektrofotometrická titrace pufru (20 $mmol.l^{-1}$ Tris, pH 8,0 a 150 $mmol.l^{-1}$ NaCl) dle popisu v kapitole 4.5.3. Absorpční spektra v oblasti 250 nm až 700 nm získaná postupnými přídavky heminu do tohoto pufru jsou znázorněna na obrázku 14A. Závislost absorbance při vlnové délce nalezeného absorpčního maxima, tedy při 387,5 nm, na množství heminu přidaného do roztoku pufru (20 $mmol.l^{-1}$ Tris, pH 8,0 a 150 $mmol.l^{-1}$ NaCl) je znázorněna na obrázku 14B.



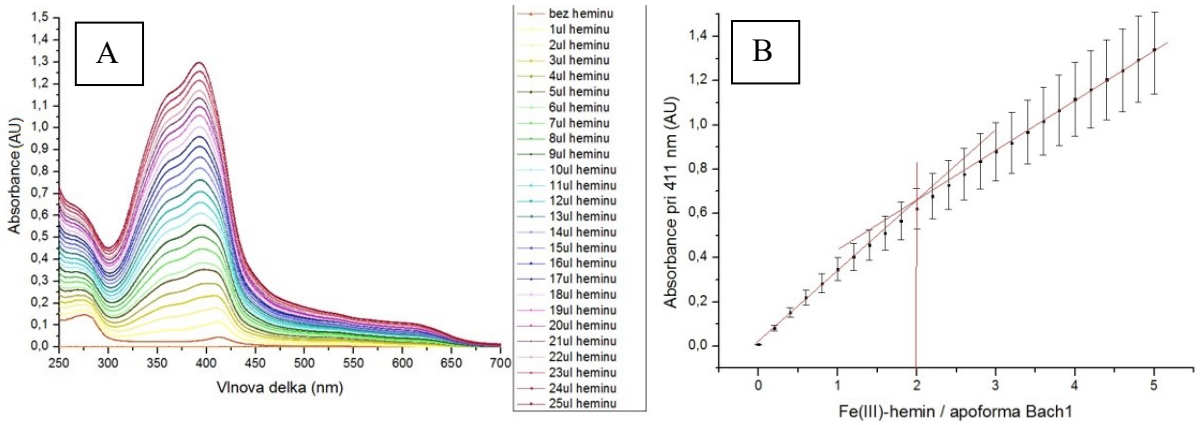
Obrázek 14 - A. Absorpční spektra v oblasti 250 nm až 700 nm získaná postupnými přídavky heminu (každý přídavek odpovídal zvýšení koncentrace heminu v roztoku o 1 $\mu mol.l^{-1}$) k pufru (20 $mmol.l^{-1}$ Tris, pH 8,0 a 150 $mmol.l^{-1}$ NaCl). B. Závislost absorbance při 387,5 nm, na množství heminu přidaného do roztoku.

Analogicky jako pro samotný pufr (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl) byla provedena také spektrofotometrická titrace směsi 60 % pufru (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl) a 40 % DMSO heminem. Absorpční spektra v oblasti 300 nm až 700 nm získaná postupnými přídavky heminu do této směsi jsou znázorněna na obrázku 15A. Závislost absorbance při vlnové délce nalezeného absorpčního maxima, tedy při 400 nm, na množství heminu přidaného do směsi 60 % pufru (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl) a 40 % DMSO je znázorněna na obrázku 15B.



Obrázek 15 - A. Absorpční spektra v oblasti 300 nm až 700 nm získaná postupnými přídavky heminu (každý přídavek odpovídal zvýšení koncentrace heminu v roztoku o 1 µmol.l^{-1}) ke směsi 60 % pufru (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl) a 40 % DMSO. B. Závislost absorbance při 400 nm na množství heminu přidaného do roztoku.

Následně byly provedeny spektrofotometrické titrace roztoků o různém složení heminem (viz kapitola 4.5.3). Nejprve byla provedena spektrofotometrická titrace roztoku apoformy Bach1 o koncentraci 5 µmol.l^{-1} v pufru (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl). Absorpční spektra v oblasti 250 nm až 700 nm získaná postupnými přídavky heminu do analyzovaného roztoku jsou znázorněna na obrázku 16A. Závislost absorbance při vlnové délce nalezeného absorpčního maxima (při 411 nm) na poměru koncentrace přidaného heminu ku koncentraci apoformy Bach1 v titrovaném roztoku je znázorněna na obrázku 16B.

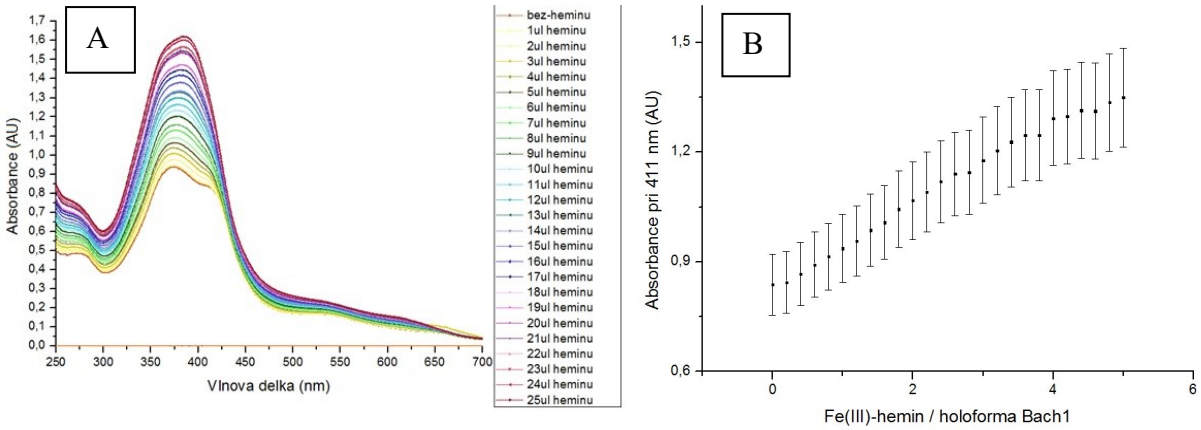


Obrázek 16 - A. Absorpční spektra v oblasti 250 nm až 700 nm získaná postupnými přídavky heminu (každý přídavek odpovídal zvýšení koncentrace heminu v roztoku o 1 µmol.l^{-1}) k roztoku apoformy Bach1 o koncentraci 5 µmol.l^{-1} v pufru (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl). B. Závislost absorbance při 411 nm na poměru koncentrace přidaného heminu ku koncentraci apoformy Bach1 v titrovaném roztoku.

Experimentální body získané vynesením závislosti absorbance titrovaného roztoku apoformy Bach1 při 411 nm na přídavku heminu, respektive poměru koncentrace přidaného heminu ku koncentraci apoformy Bach1 v titrovaném roztoku, byly proloženy regresními přímkami. V průsečíku těchto přímek byl odečten počet molekul hemu, které specificky interagují s původní apoformou Bach1 (tzv. „bod ekvivalence“ – viz také kapitola 2.5.1). Poměr koncentrace přidaných molekul heminu ku koncentraci apoformy Bach1 měl v „bodě ekvivalence“ hodnotu 2,0 ± 0,6. Stanovená hodnota odpovídá interakci přibližně dvou molekul heminu s jednou molekulou Bach1, který se v roztoku vyskytoval původně v apoformě. Ze získaných výsledků je také patrné, že nejprve pozorujeme absorpční maximum při 411 nm a postupně (především po překonání „bodu ekvivalence“) se toto maximum přesouvá k 387,5 nm. Pro ověření míry saturace proteinu Bach1 heminem byla využita závislost zvyšující se absorbance roztoku, který obsahoval pouze 20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl při titrace heminem (viz obrázek 14). Výsledky experimentů využívající směs 60 % pufru (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl) a 40 % DMSO, která má lepší stabilizační vlastnosti působící proti agregaci molekul heminu (viz obrázek 15), nebyla využita. Důvodem byl výskyt absorpčního maxima při 400 nm, které by mohlo interferovat s absorpčním maximem heminu specificky vázaného ve struktuře Bach1. Hodnota směrnice přímky proložené hodnotami absorbancí před „bodem ekvivalence“ je vyšší než hodnota směrnice přímky tvořena body za „bodem ekvivalence“ (druhá směrnice se

blíží případu, kdy molekuly heminu byly přidávány do pufru, tj. nevykazují specifickou interakci s proteinem).

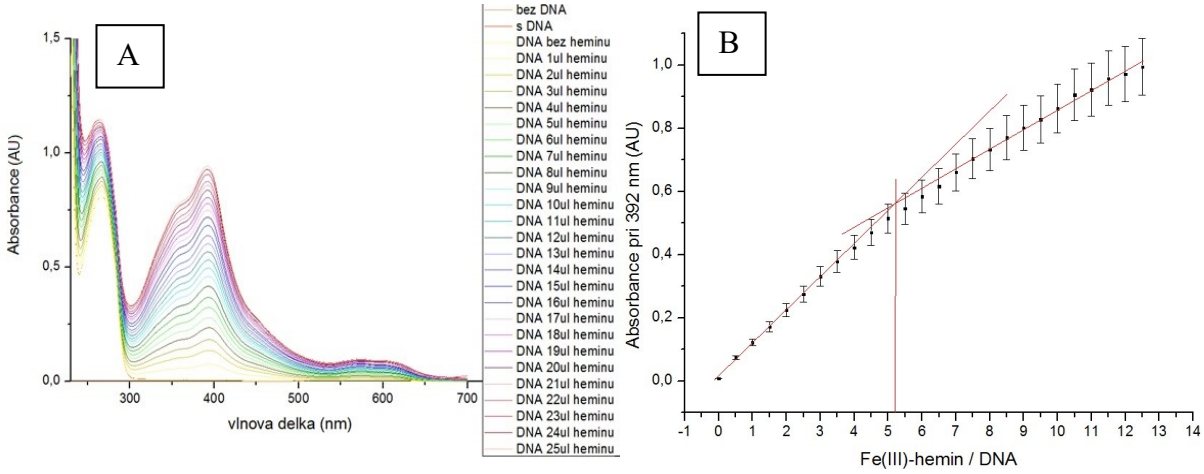
Stejným způsobem jako v případě apoformy Bach1 byla provedena spektrofotometrická titrace také pro holoformu Bach1. Roztok holoformy o koncentraci 5 μmol.l^{-1} v pufru (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl) byl titrován postupnými přídavky heminu. Absorpční spektra v oblasti 250 nm až 700 nm, která byla získána v průběhu této titrace, jsou znázorněna na obrázku 17A. Závislost absorbance při vlnové délce 411 nm na poměru koncentrace přidaného heminu ku koncentraci holoformy Bach1 v titrovaném roztoku je znázorněna na obrázku 17B.



Obrázek 17 - A. Absorpční spektra v oblasti 250 nm až 700 nm získaná postupnými přídavky heminu (každý přídavek odpovídal zvýšení koncentrace heminu v roztoku o 1 μmol.l^{-1}) k roztoku holoformy Bach1 o koncentraci 5 μmol.l^{-1} v pufru (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl). B. Závislost absorbance při 411 nm na poměru koncentrace přidaného heminu ku koncentraci holoformy Bach1 v titrovaném roztoku.

Tato spektrofotometrická titrace byla provedena pro ověření míry saturace holoformy Bach1 hemem. Žádná další specifická vazba heminu do struktury holoformy Bach1 nebyla spektrofotometricky pozorována.

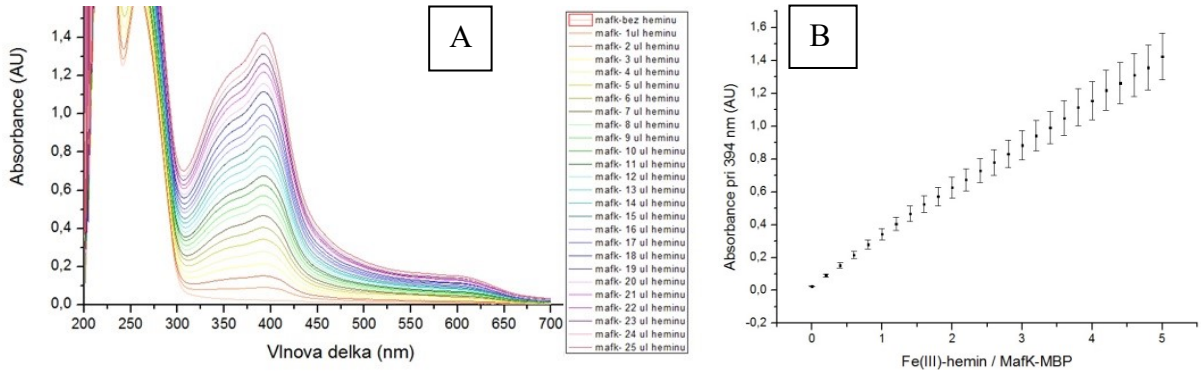
Byla provedena také spektrofotometrická titrace roztoku DNA obsahující MARE úseky o koncentraci těchto MARE úseků 0,7 μmol.l^{-1} heminem. Absorpční spektra v oblasti 250 nm až 700 nm, která byla získána v průběhu této titrace, jsou znázorněna na obrázku 18A. Závislost absorbance při vlnové délce 392 nm na poměru koncentrace přidaného heminu ku koncentraci MARE úseků v titrovaném roztoku je znázorněna na obrázku 18B.



Obrázek 18 - A. Absorpční spektra v oblasti 250 nm až 700 nm získaná postupnými přídavky heminu (každý přídavek odpovídal zvýšení koncentrace heminu v roztoku o 1 µmol.l^{-1}) k roztoku DNA obsahující MARE úseky o koncentraci MARE úseků 0,7 µmol.l^{-1} v pufru (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl). B. Závislost absorbance při 392 nm na poměru koncentrace přidaného heminu ku koncentraci MARE úseků v titrovaném roztoku.

V grafickém znázornění závislosti absorbance titrovaného roztoku MARE úseků při 392 nm na poměru koncentrace přidaného heminu ku koncentraci MARE úseků byl analogickým způsobem jako v případě spektrofotometrické titrace apoformy Bach1 heminem odečten „bod ekvivalence“. Tento „bod ekvivalence“ odpovídá počtu molekul heminu, které jsou schopny interagovat s DNA obsahující MARE úsek. Poměr koncentrace přidaných molekul heminu ku koncentraci MARE úseků měl v „bodě ekvivalence“ hodnotu 5,2 ± 0,9.

Dále byla provedena spektrofotometrická titrace roztoku MafK-MBP o koncentraci 5 µmol.l^{-1} v pufru (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl). Absorpční spektra v oblasti 200 nm až 700 nm získaná postupnými přídavky heminu do analyzovaného roztoku jsou znázorněna na obrázku 19A. Závislost absorbance při vlnové délce nalezeného absorpčního maxima (při 394 nm) na poměru koncentrace přidaného heminu ku koncentraci MafK-MBP v titrovaném roztoku je znázorněna na obrázku 19B.

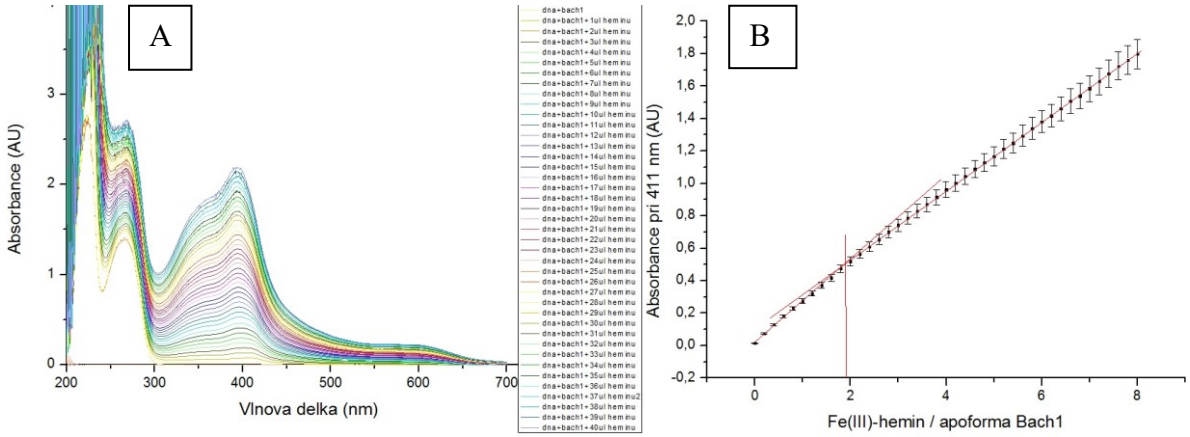


Obrázek 19 - A. Absorpční spektra v oblasti 200 nm až 700 nm získaná postupnými přídavky heminu (každý přídavek odpovídal zvýšení koncentrace heminu v roztoku o 1 µmol.l^{-1}) k roztoku MafK-MBP o koncentraci 5 µmol.l^{-1} v pufru (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl). B. Závislost absorbance při 394 nm na poměru koncentrace přidaného heminu ku koncentraci MafK-MBP v titrovaném roztoku.

Nebyl nalezen „bod ekvivalence“, MafK-MBP tedy pravděpodobně s molekulami heminu specificky neinteraguje.

5.8 Spektrofotometrická titrace roztoků vzájemných směsí makromolekul Bach1, MafK-MBP a DNA obsahující MARE úseky heminem

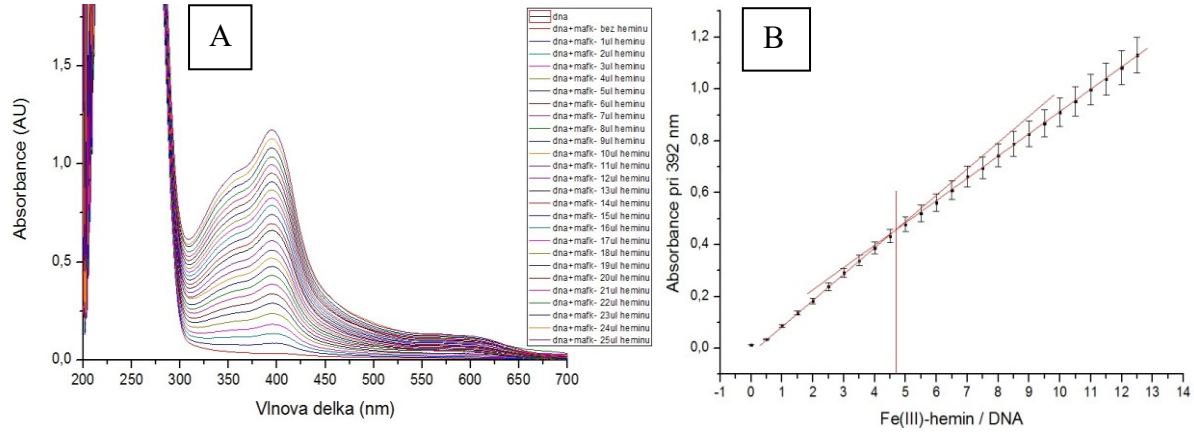
Po provedení spektrofotometrických titrací roztoků obsahujících pouze jeden typ příslušných makromolekul (Bach1, MafK-MBP a DNA obsahující MARE úseky) heminem byly provedeny spektrofotometrické titrace jejich vzájemných směsí s přídavky heminu. Nejprve byla provedena spektrofotometrická titrace roztoku apoformy Bach1 o koncentraci 5 µmol.l^{-1} a DNA obsahující MARE úseky o koncentraci MARE úseků 0,7 µmol.l^{-1} v pufru (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl) s přídavky heminu. Absorpční spektra v oblasti 200 nm až 700 nm získaná postupnými přídavky heminu do analyzovaného roztoku jsou znázorněna na obrázku 20A. Závislost absorbance při vlnové délce 411 nm na poměru koncentrace přidaného heminu ku koncentraci apoformy Bach1 v titrovaném roztoku je znázorněna na obrázku 20B.



Obrázek 20 - A. Absorpční spektra v oblasti 200 nm až 700 nm získaná postupnými přídavky heminu (každý přídavek odpovídal zvýšení koncentrace heminu v roztoku o 1 µmol.l^{-1}) k roztoku apoformy Bach1 o koncentraci 5 µmol.l^{-1} a DNA obsahující MARE úseky o koncentraci MARE úseků 0,7 µmol.l^{-1} v pufru (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl). B. Závislost absorbance při 411 nm na poměru koncentrace přidaného heminu ku koncentraci apoformy Bach1 v titrovaném roztoku.

V grafickém znázornění závislosti absorbance titrovaného roztoku apoformy Bach1 s DNA obsahující MARE úseky při 411 nm na poměru koncentrace přidaného heminu ku koncentraci apoformy Bach1 byl odečten „bod ekvivalence“. Tento „bod ekvivalence“ odpovídá počtu molekul heminu, které jsou schopny interagovat s apoformou Bach1 v přítomnosti DNA obsahující MARE úseky. Poměr koncentrace přidaných molekul heminu ku koncentraci apoformy Bach1 měl v „bodě ekvivalence“ hodnotu 1,9 ± 0,6. Stanovená hodnota odpovídá interakci přibližně dvou molekul heminu s jednou molekulou původní apoformy Bach1 v přítomnosti DNA obsahující MARE úseky. Interakce heminu s DNA analogická k experimentu, jehož výsledky jsou prezentovány na obrázku 18, nebyla v tomto případě (tedy za přítomnosti Bach1) spektrofotometricky prokázána.

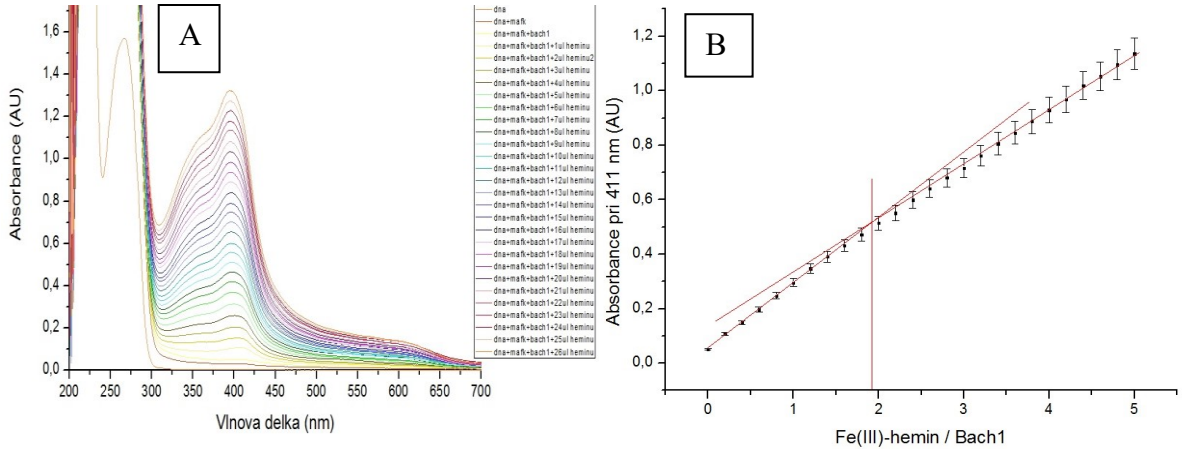
Dále byla provedena spektrofotometrická titrace směsi MafK-MBP o koncentraci 5 µmol.l^{-1} a DNA obsahující MARE úseky o koncentraci MARE úseků 0,7 µmol.l^{-1} v pufru (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl) s přídavky heminu. Absorpční spektra v oblasti 200 nm až 700 nm získaná postupnými přídavky heminu do analyzovaného roztoku jsou znázorněna na obrázku 21A. Závislost absorbance při vlnové délce 392 nm na poměru koncentrace přidaného heminu ku koncentraci MARE úseků v titrovaném roztoku je znázorněna na obrázku 21B.



Obrázek 21 - A. Absorpční spektra v oblasti 200 nm až 700 nm získaná postupnými přídavky heminu (každý přídavek odpovídal zvýšení koncentrace heminu v roztoku o 1 µmol.l^{-1}) k roztoku MafK-MBP o koncentraci 5 µmol.l^{-1} a DNA obsahující MARE úseky o koncentraci MARE úseků 0,7 µmol.l^{-1} v pufru (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl). B. Závislost absorbance při 392 nm na poměru koncentrace přidaného heminu ku koncentraci MARE úseků v titrovaném roztoku.

V grafickém znázornění závislosti absorbance titrovaného roztoku MafK-MBP s DNA obsahující MARE úseky při 392 nm na poměru koncentrace přidaného heminu ku koncentraci MARE úseků byl odečten „bod ekvivalence“. Příslušný „bod ekvivalence“ by mohl odpovídat počtu molekul heminu, které jsou schopny interagovat s DNA obsahující MARE úseky v přítomnosti MafK-MBP. Poměr koncentrace přidaných molekul heminu ku koncentraci MARE úseků měl v „bodě ekvivalence“ hodnotu 4,8 ± 0,6.

Na závěr byla provedena spektrofotometrická titrace roztoku apoformy Bach1 o koncentraci 5 µmol.l^{-1}, MafK-MBP o koncentraci 5 µmol.l^{-1} a DNA obsahující MARE úseky o koncentraci MARE úseků 0,7 µmol.l^{-1} v pufru (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl) s postupnými přídavky heminu. Absorpční spektra v oblasti 200 nm až 700 nm získaná postupnými přídavky heminu do analyzovaného roztoku jsou znázorněna na obrázku 22A. Závislost absorbance při vlnové délce 411 nm na poměru koncentrace přidaného heminu ku koncentraci apoformy Bach1 v titrovaném roztoku je znázorněna na obrázku 22B.

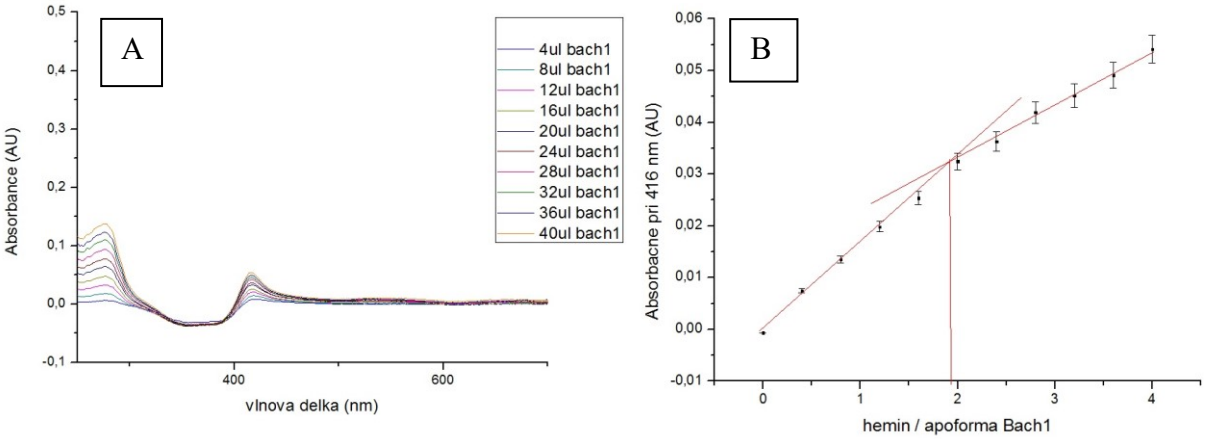


Obrázek 22 - A. Absorpční spektra v oblasti 200 nm až 700 nm získaná postupnými přídavky heminu (každý přídavek odpovídal zvýšení koncentrace heminu v roztoku o 1 µmol.l^{-1}) k roztoku apoformy Bach1 o koncentraci 5 µmol.l^{-1}, MafK-MBP o koncentraci 5 µmol.l^{-1} a DNA obsahující MARE úseky o koncentraci MARE úseků 0,7 µmol.l^{-1} v pufru (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl). B. Závislost absorbance při 411 nm na poměru koncentrace přidaného heminu ku koncentraci apoformy Bach1 v titrovaném roztoku.

V grafickém znázornění závislosti absorbance titrovaného roztoku apoformy Bach1 s MafK-MBP a DNA obsahující MARE úseky při 411 nm na poměru koncentrace přidaného heminu ku koncentraci apoformy Bach1 byl odečten „bod ekvivalence“. Tento „bod ekvivalence“ odpovídá počtu molekul heminu, které jsou schopny interagovat s apoformou Bach1 v přítomnosti MafK-MBP a DNA obsahující MARE úseky. Poměr koncentrace přidaných molekul heminu ku koncentraci apoformy Bach1 měl v „bodě ekvivalence“ hodnotu 1,9 ± 0,6. Stanovená hodnota odpovídá interakci přibližně dvou molekul heminu s jednou molekulou původní apoformy Bach1 v přítomnosti MafK-MBP a DNA obsahující MARE úseky.

5.9 Reverzní spektrofotometrická titrace roztoku heminu apoformou Bach1

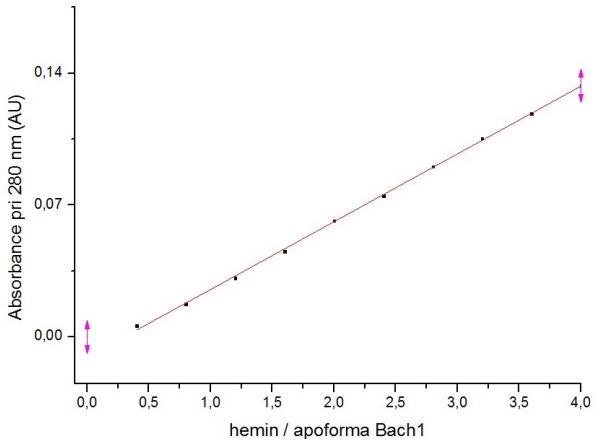
Reverzní spektrofotometrická titrace roztoku heminu apoformou Bach1 byla provedena postupem popsaným v kapitole 4.5.4. Roztok heminu o koncentraci 5 µmol.l^{-1} v pufru (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl) byl titrován postupnými přídavky apoformy Bach1 až do dosažení koncentrace apoformy Bach1 v titrovaném roztoku 10 µmol.l^{-1}. Absorpční spektra v oblasti 250 nm až 700 nm získaná postupnými přídavky apoformy Bach1 do roztoku heminu v pufru jsou znázorněna na obrázku 23A. Závislost absorbance při vlnové délce nalezeného absorpčního maxima v oblasti Soretova píku (při 416 nm) na poměru koncentrace heminu ku koncentraci přidané apoformy Bach1 v titrovaném roztoku je znázorněna na obrázku 23B.



Obrázek 23 - A. Absorpční spektra v oblasti 250 nm až 700 nm získaná postupnými přídavky apoformy Bach1 (každý přídavek odpovídal zvýšení koncentrace apoformy Bach1 v roztoku o 1 µmol.l^{-1}) k roztoku heminu o koncentraci 5 µmol.l^{-1} v pufru (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl). B. Závislost absorbance při 416 nm na poměru koncentrace heminu ku koncentraci přidané apoformy Bach1 v titrovaném roztoku.

Experimentální body získané vynesením závislosti absorbance titrovaného roztoku heminu při 416 nm na přídavku apoformy Bach1, respektive poměru koncentrace heminu ku koncentraci přidané apoformy Bach1 v titrovaném roztoku, byly proloženy regresními přímkami. V průsečíku těchto přímek byl odečten počet molekul hemu, které specificky interagují s původní apoformou Bach1 (tzv. „bod ekvivalence“). Poměr koncentrace molekul heminu ku koncentraci přidaných molekul apoformy Bach1 měl v „bodě ekvivalence“ hodnotu 1,9 ± 0,6. Stanovená hodnota odpovídá interakci přibližně dvou molekul heminu s jednou molekulou Bach1.

Výhodou provedení reverzní spektrofotometrcké titrace je, že veškeré spektrální změny jsou ovlivněny výhradně přídavky apoformy Bach1. Dokladem této skutečnosti je lineární závislost hodnoty absorbance při 280 nm na poměru koncentrace heminu ku koncentraci přidané apoformy Bach1 v titrovaném roztoku (viz obrázek 24).

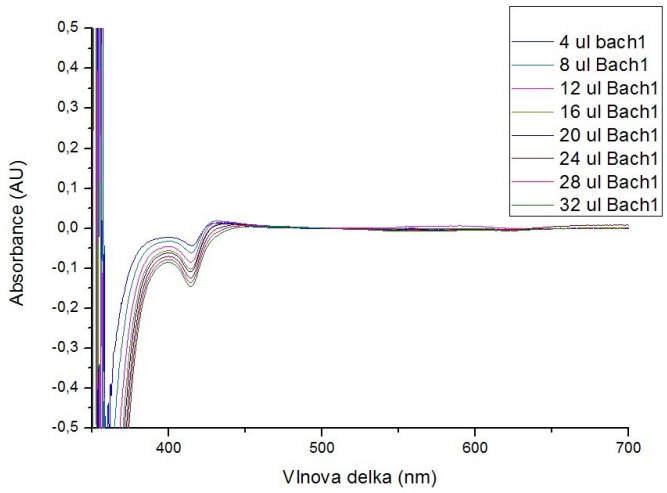


Obrázek 24 - Závislost absorbance při 280 nm na poměru koncentrace heminu ku koncentraci přidané apoformy Bach1 v titrovaném roztoku.

5.10 Vliv jiných redoxních a ligandových stavů iontu železa v hemu na koordinační vlastnosti Bach1

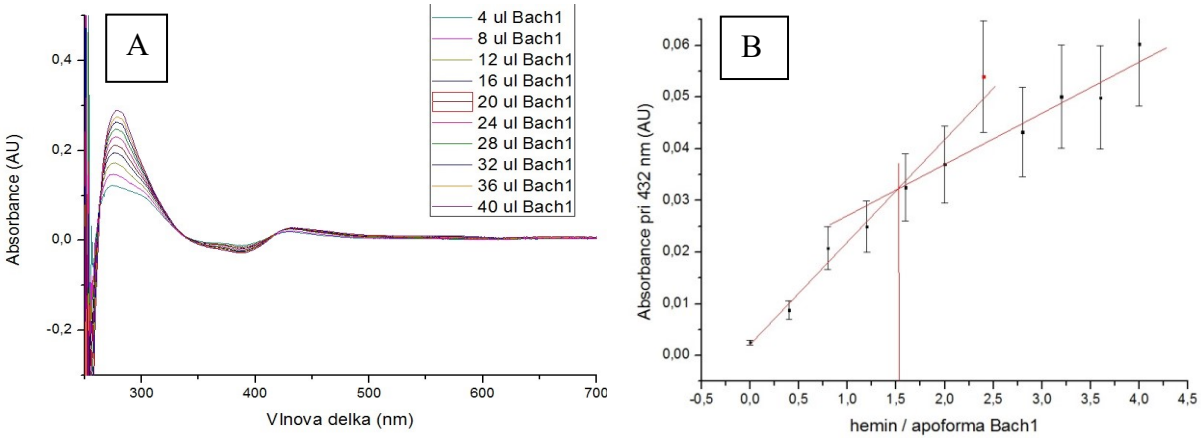
Reverzní spektrofotometrická titrace roztoku heminu apoformou Bach1 v přítomnosti dithioničitanu sodného, respektive sulfidu sodného, byla provedena postupem popsaným v kapitole 4.5.5.

Nejprve byl roztok heminu o koncentraci 5 $\mu mol.l^{-1}$ s čerstvým přídavkem dithioničitanu sodného (výsledná koncentrace v roztoku 10 $mmol.l^{-1}$) v pufru (20 $mmol.l^{-1}$ Tris, pH 8,0 a 150 $mmol.l^{-1}$ NaCl) titrován postupnými přídavky apoformy Bach1 až do koncentrace apoformy Bach1 v titrovaném roztoku 9 $\mu mol.l^{-1}$. Absorpční spektra v oblasti 300 nm až 700 nm získaná postupnými přídavky apoformy Bach1 do roztoku heminu a dithioničitanu sodného v pufru jsou znázorněna na obrázku 25. Při této reverzní titraci nebylo nalezeno žádné absorpční maximum odpovídající Soretovu píku. S experimentálním uspořádáním daného experimentu silně interferovaly absorpční vlastnosti dithioničitanu sodného.



Obrázek 25 - Absorpční spektra v oblasti 300 nm až 700 nm získaná postupnými přídavky apoformy Bach1 (každý přídavek odpovídal zvýšení koncentrace apoformy Bach1 v roztoku o 1 µmol.l^{-1}) k roztoku heminu o koncentraci 5 µmol.l^{-1} a dithioničitanu sodného o koncentraci 10 mmol.l^{-1} v pufru (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl).

Následně byl titrován roztok heminu o koncentraci 5 µmol.l^{-1} s čerstvým přídavkem sulfidu sodného (výsledná koncentrace sulfidu sodného v roztoku 5 mmol.l^{-1}) v pufru (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl) postupnými přídavky apoformy Bach1 až do koncentrace apoformy Bach1 v titrovaném roztoku 10 µmol.l^{-1}. Absorpční spektra v oblasti 250 nm až 700 nm získaná postupnými přídavky apoformy Bach1 do roztoku heminu a sulfidu sodného v pufru jsou znázorněna na obrázku 26A. Závislost absorbance při vlnové délce nalezeného absorpčního maxima odpovídajícího Soretovu píku, tedy při 432 nm, na poměru koncentrace heminu ku koncentraci přidané apoformy Bach1 v titrovaném roztoku je znázorněna na obrázku 26B.



Obrázek 26 - A. Absorpční spektra v oblasti 250 nm až 700 nm získaná postupnými přídavky apoformy Bach1 (každý přídavek odpovídal zvýšení koncentrace apoformy Bach1 v roztoku o 1 µmol.l^{-1}) k roztoku heminu o koncentraci 5 µmol.l^{-1} a sulfidu sodného o koncentraci 5 mmol.l^{-1} v pufru (20 mmol.l^{-1} Tris, pH 8,0 a 150 mmol.l^{-1} NaCl). B. Závislost absorbance při 432 nm na poměru koncentrace heminu ku koncentraci přidané apoformy Bach1 v titrovaném roztoku obsahujícím sulfid sodný.

Experimentální body získané vynesením závislosti absorbance titrovaného roztoku heminu v přítomnosti sulfidu sodného při 432 nm na přídavku apoformy Bach1, respektive poměru koncentrace heminu ku koncentraci přidané apoformy Bach1 v titrovaném roztoku, byly proloženy regresními přímkami. V průsečíku těchto přímek byl odečten počet molekul hemu, které specificky interagují s původní apoformou Bach1 v přítomnosti sulfidu sodného (tzv. „bod ekvivalence“). Poměr koncentrace molekul heminu ku koncentraci přidaných molekul apoformy Bach1 měl v „bodě ekvivalence“ hodnotu 1,5 ± 0,4.

5.11 Stanovení celkové koncentrace iontů železa v preparátech proteinu Bach1 pomocí AAS

Metoda AAS byla využita pro stanovení obsahu iontů železa v preparátu apoformy Bach1. Protože každá molekula hemu ve svém středu obsahuje jeden ion železa, mělo toto stanovení potvrdit skutečnost, zda se jedná skutečně o apoformu a tento preparát tedy neobsahuje signifikantní množství hemu. Koncentrace iontů železa a tím nepřímo koncentrace molekul hemu v preparátu apoformy Bach1 o koncentraci 75,2 µmol.l^{-1} byla stanovena jako 1,07 ± 0,05 µmol.l^{-1}. Tento výsledek znamená, že v průměru se v preparátu apoformy Bach1 vyskytovala přibližně jedna molekula hemu na 75 molekul proteinu Bach1.

Stanovení obsahu iontů železa pomocí AAS bylo provedeno také v preparátu holoformy Bach1 o koncentraci proteinu 31,5 µmol.l^{-1}. Stanovená koncentrace iontů železa (a tím nepřímo koncentrace molekul hemu) v tomto preparátu měla hodnotu 88,3 ± 3,8 µmol.l^{-1}.

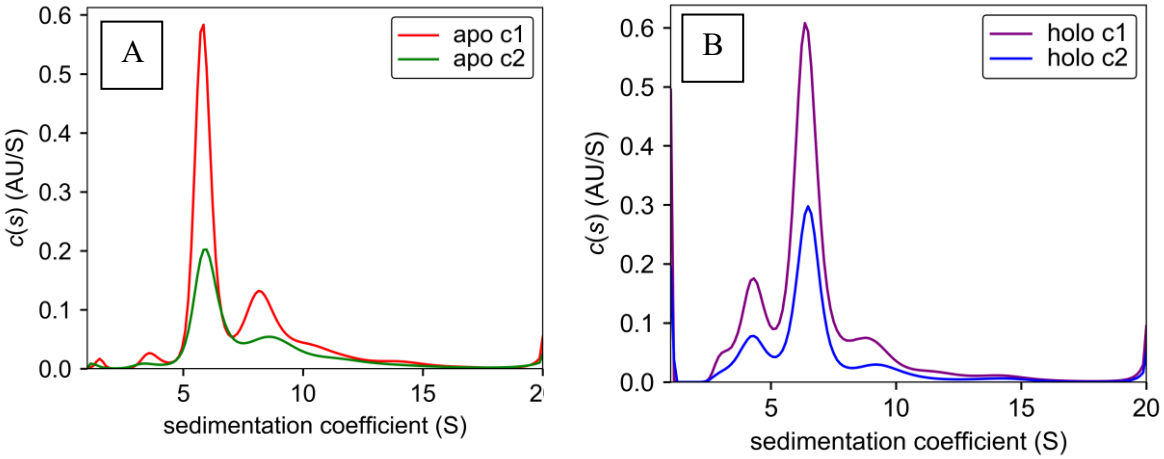
Tato hodnota odpovídá obsahu přibližně dvou až tří molekul hemu v preparátu proteinu Bach1 izolovaném v jeho holoformě.

Dále bylo provedeno stanovení koncentrace iontů železa pomocí AAS v preparátu apoformy Bach1 podrobeného spektrofotometrické titraci heminem a následnému odstranění nespecificky vázaných molekul heminu gelovou permeační chromatografií. Koncentrace proteinu Bach1 v takto připraveném preparátu byla 3,7 μmol.l^{-1}. Stanovená koncentrace iontů železa (a nepřímo tedy koncentrace molekul hemu) v tomto preparátu měla hodnotu 8,5 ± 0,2 μmol.l^{-1}, což odpovídá interakci přibližně dvou molekul hemu s proteinem Bach1.

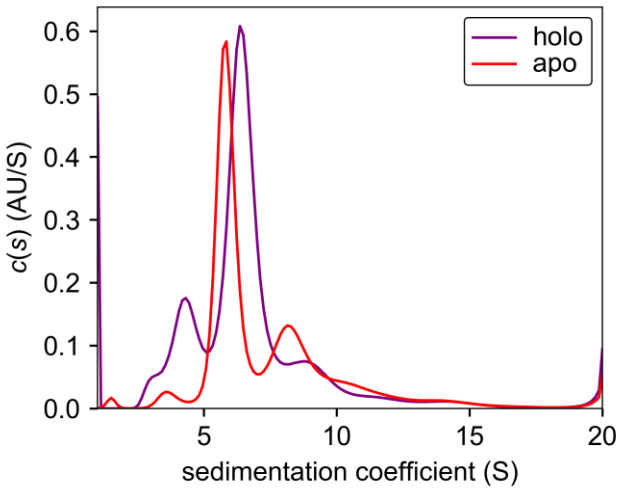
5.12 Analytická ultracentrifugace proteinu Bach1

Analytická ultracentrifugace proteinu Bach1 v jeho apoformě a holoformě byla provedena dle postupu, který je popsán v kapitole 4.7. Analýzou získaných dat bylo v případě apoformy i holoformy Bach1 zjištěno, že se obě formy daného proteinu vyskytují v roztoku převážně ve formě dimerů. Hodnota zdánlivé molekulové hmotnosti těchto dimerů (stanovena pomocí programu Sedfit) byla v případě holoformy Bach1 140 kDa (reálná molekulová hmotnost přibližně 164 kDa v případě vazby dvou molekul hemu), respektive 170 kDa pro apoformu Bach1 (reálná molekulová hmotnost 163 kDa). Hodnota sedimentačního koeficientu korigovaná pro vodu jako rozpouštědlo a 20 °C, $S_{20,w}$, byla v případě dimeru holoformy Bach1 6,7 S, pro apoformu Bach1 ve formě dimeru byla tato hodnota 6,3 S. Data naměřená pomocí AUC jsou znázorněna graficky ve formě distribuce hodnot sedimentačního koeficientu na obrázku 27A pro apoformu Bach1, respektive na obrázku 27B pro holoformu Bach1. Srovnání získaných distribucí hodnot sedimentačního koeficientu pro vzorek apoformy Bach1 a holoformy Bach1 je znázorněno na obrázku 28. V preparátech apoformy i holoformy Bach1 byly nalezeny také určité podíly proteinů v jiných oligomerních stavech (v monomerním, respektive tetramerním stavu). Podíl monomeru Bach1 ve vzorku jeho apoformy (zdánlivá molekulová hmotnost 75 kDa, $S_{20,w}$ = 3,6 S) byl přibližně 5 %, podíl dimeru byl přibližně 60 % a podíl tetrameru v tomto preparátu (zdánlivá molekulová hmotnost 330 kDa, $S_{20,w}$ = 9,4 S) činil přibližně 25 %. V případě holoformy Bach1 byl obsah monomeru (zdánlivá molekulová hmotnost 65 kDa, $S_{20,w}$ = 4,4 S) přibližně 20 %, obsah dimeru přibližně 60 % a tetramerní forma (zdánlivá molekulová hmotnost 255 kDa, $S_{20,w}$ = 9,8 S) tvořila přibližně 10 % celkového preparátu. Na základě AUC experimentů bylo odhaleno odlišné oligomerní složení preparátu apoformy a holoformy Bach1 a také odlišné hodnoty $S_{20,w}$ těchto preparátů, které jsou vyšší v případě vzorku holoformy Bach1. Závislost

oligomerního složení preparátů Bach1 na koncentraci proteinu v roztoku nebyla ve zvoleném intervalu pozorována.



Obrázek 27 - Distribuce hodnot sedimentačního koeficientu apoformy Bach1 (A) a holoformy Bach1 (B). Červená křivka v části A a fialová křivka v části B odpovídají vzorkům Bach1 o koncentraci 30 µmol.l^{-1}. Zelená křivka v části A a modrá křivka v části B odpovídají vzorkům Bach1 o koncentraci 15 µmol.l^{-1}.



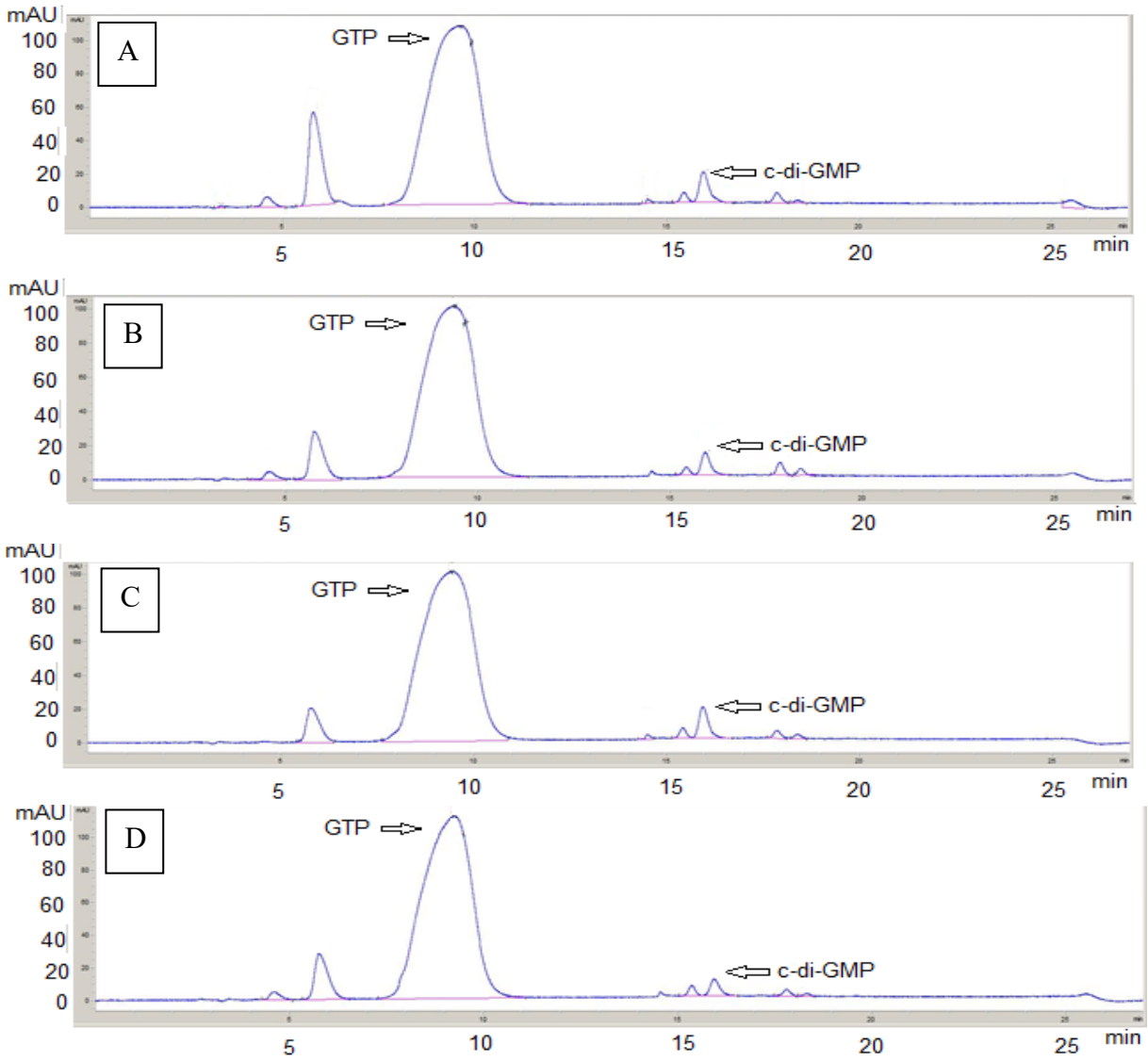
Obrázek 28 - Srovnání distribuce hodnot sedimentačního koeficientu pro apoformu a holoformu Bach1. Koncentrace obou vzorků Bach1 byla 30 µmol.l^{-1}.

YddV-MBP

5.13 Stanovení katalytické aktivity proteinu YddV-MBP WT a jeho mutantu Y43A v přítomnosti sulfidu sodného pomocí HPLC

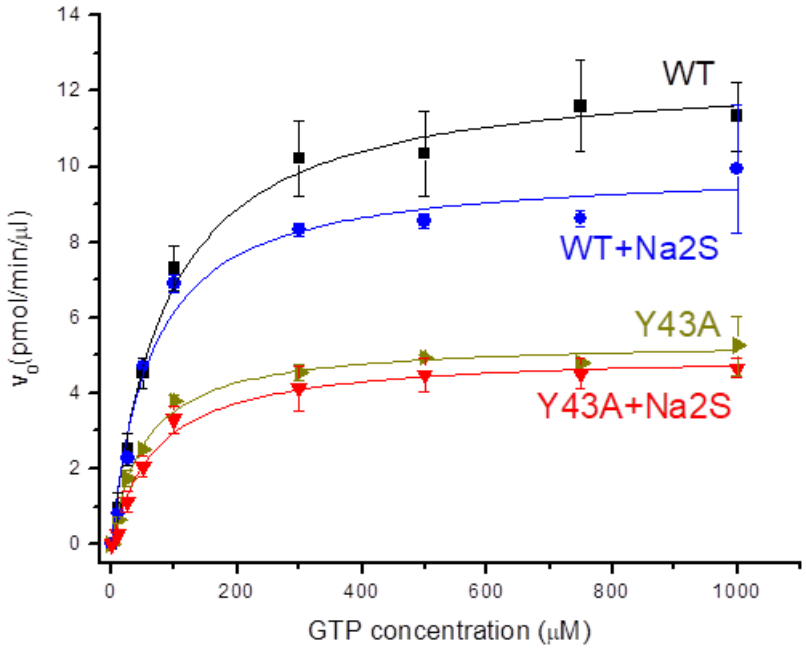
Pro optimalizaci experimentů se sulfidem sodným byl nejprve zkoumán jeho vliv na jiný hemový senzorový protein, YddV-MBP WT a jeho mutant Y43A. Konkrétně byl

sledován vliv sulfidu sodného na diguanylátcyklasovou aktivitu YddV-MBP v jeho přirozené formě (WT) a mutantní formě (Y43A). Způsob stanovení těchto aktivit je popsán v kapitole 4.6.1. Ukázkové chromatogramy získané analýzou jednotlivých preparátů (YddV-MBP WT, YddV-MBP Y43A, YddV-MBP WT v přítomnosti sulfidu sodného a YddV-MBP Y43A v přítomnosti sulfidu sodného) s přídavkem GTP o původní koncentraci v reakční směsi 1000 µmol.l^{-1} jsou znázorněny na obrázku 29.



Obrázek 29 - Chromatogramy získané HPLC analýzou preparátů YddV-MBP WT (A), YddV-MBP Y43A (B), YddV-MBP WT v přítomnosti sulfidu sodného (C) a YddV-MBP Y43A v přítomnosti sulfidu sodného (D) s přídavkem GTP o původní koncentraci v reakční směsi 1000 µmol.l^{-1}.

Ve výsledných chromatogramech byla stanovena plocha píku reakčního produktu, tj. c-di-GMP (eluční čas 15,9 min) na základě kalibrace plochy píku získaného pro standard c-di-GMP v roztoku o koncentraci 100 μmol.l^{-1}. Díky znalosti doby reakce (2,5 minuty) a objemu odebrané reakční směsi (10 μl) bylo možno vypočítat hodnoty počáteční rychlosti pro různé výchozí koncentrace GTP v příslušných preparátech. Závislost počáteční rychlosti na výchozí koncentraci GTP v reakční směsi je pro jednotlivé preparáty znázorněna na obrázku 30. Michaelisova konstanta, K_M, hodnota maximální rychlosti enzymové reakce, V_{max}, katalytická konstanta, k_{cat}, a poměr k_{cat}/K_M byly pro danou enzymovou reakci vypočteny z příslušné závislosti pomocí nelineární regrese s využitím metody nejmenších čtverců a rovnice Michaelise a Mentenové. Výsledné hodnoty K_M, V_{max}, k_{cat} a k_{cat}/K_M pro jednotlivé preparáty jsou shrnuty v tabulce 7.



Obrázek 30 - Závislost počáteční rychlosti na výchozí koncentraci GTP v reakční směsi pro preparáty YddV-MBP WT (černá křivka), YddV-MBP Y43A (hnědá křivka), YddV-MBP WT v přítomnosti sulfidu sodného (modrá křivka) a YddV Y43A v přítomnosti sulfidu sodného (červená křivka).

Tabulka 7 - Výsledné hodnoty Michaelisovy konstanty (K_M), maximální rychlosti enzymové reakce (V_{max}), katalytické konstanty (k_{cat}) a poměru k_{cat}/K_M stanovené pro guanylátcyklasovou enzymovou reakci jednotlivých preparátů YddV-MBP.

Preparát	K_M (μmol.l-^{1})	V_{max} (pmol c-di-GMP.min^{-1}.μl^{-1})	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M (mol^{-1}.l.s^{-1})
YddV-MBP WT	84 ± 21	12 ± 1	1,2	238
YddV-MBP Y43A	54 ± 11	5,4 ± 0,3	0,54	167
YddV-MBP WT + Na_2S	62 ± 16	10 ± 0,8	1,0	269
YddV-MBP Y43A + Na_2S	72 ± 12	5,1 ± 0,3	0,51	118

6 Diskuze

Vzhledem k schopnosti proteinu Bach1 regulovat míru oxidativního stresu v buňce, představuje tento protein významný cíl vědeckého zkoumání s velkým praktickým uplatněním. Současný stav poznání vlastností a funkcí Bach1 je shrnut v kapitole 2.4.2 této práce a týkají se ho informace z uvedených publikací [74-82,85-87]. Vzhledem k možným souvislostem mezi aktivitou proteinu Bach1 a vývojem některých nemocí kardiovaskulárního, trávicího či imunitního systému (prostřednictvím zvýšení oxidačně-redukčního stresu), představuje protein Bach1 možný cíl zásahu při léčbě zmíněných patologických procesů [79]. Navzdory evidentnímu klinickému významu Bach1 není tento protein doposud důkladně prostudován. Kromě neznalosti struktury Bach1 v plnodélkové formě chybí v literatuře také jeho detailní biochemická a biofyzikální charakteristika, případně jsou některé výsledky ve vzájemném rozporu (viz níže) [80,81]. Z těchto důvodů bylo rozhodnuto zaměřit diplomovou práci na problematiku tohoto signálního proteinu a přispět k objasnění funkce Bach1 v živých organismech. Tato práce se zabývá především zkoumáním mechanismu interakce molekul hemu s Bach1 a na to, zda daná interakce ovlivní některé vlastnosti Bach1. V literatuře dosud panují nejasnosti ohledně počtu molekul hemu, které interagují s proteinem Bach1. Některé zdroje [81] uvádí interakci jedné molekuly hemu s Bach1, zatímco jiní autoři [80] popisují interakci Bach1 až s pěti molekulami hemu. Součástí této diplomové práce je proto detailní popis interakčních schopností proteinu Bach1 s hemem za různých podmínek, respektive za přítomnosti různých interakčních partnerů.

Aby bylo možno studovat výše zmíněné vlastnosti proteinu Bach1, bylo nejprve potřeba připravit dostatečné množství studovaného proteinu rekombinantní expresí. Plasmidová DNA potřebná pro expresi proteinu Bach1 v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) byla připravena již v rámci předcházející bakalářské práce [96]. Samotná exprese proteinu ve zmíněných buňkách proběhla úspěšně, nicméně míra této exprese nebyla velká. Tato skutečnost byla pravděpodobně způsobena produkcí proteinu v prokaryotickém expresním systému, přičemž fyziologicky se tento protein vyskytuje výhradně v eukaryotických organismech. Pokud uvážíme tyto faktory spolu s velikostí proteinu Bach1, nebyla míra exprese tohoto proteinu výrazně nižší ve srovnání s podobně velkými eukaryotickými proteiny produkovanými v prokaryotických systémech [69]. Proto bylo rozhodnuto se, podobně jako v případě studií jiných eukaryotických hemových senzorových proteinů [69], v prvotních stádiích experimentů spokojit s prokaryotickou expresí Bach1. Je třeba také poznamenat, že téměř všichni autoři dosavadních studií, v rámci kterých byl protein Bach1 (případně některé jeho

domény) izolován, využívali prokaryotickou expresi tohoto eukaryotického proteinu [75,79-82,86].

Na základě informací z literatury [100] bylo rozhodnuto pokusit se o optimalizaci prokaryotické exprese Bach1 prostřednictvím modifikace složení expresního média se zaměřením na vliv sorbitolu a betainu monohydrátu na míru exprese Bach1. Nepodařilo se ovšem prokázat pozitivní efekt těchto složek na míru exprese Bach1, a proto bylo od používání těchto modifikací upuštěno. Důvodem tohoto zjištění by mohla být například nedostatečná čistota použitých chemikálií. Navíc byla v rámci této diplomové práce připravena myší forma proteinu Bach1, kdyžto autoři uvedené studie [100] pracovali s lidskou verzí tohoto proteinu. Mírně se lišily také podmínky exprese - autoři studie [100] prováděli inkubaci buněk *E. coli* BL-21(DE3) po přídavku IPTG v kratší době a při vyšší teplotě. Všechny zmíněné faktory mohly ovlivnit výsledky optimalizace prokaryotické exprese Bach1 a způsobit nereprodukovatelnost optimalizace popsané v literatuře [100].

Následné izolace Bach1 v apoformě i holoformě proběhly úspěšně, nicméně výtěžek těchto izolací byl, vzhledem k nízké míře exprese (jak již bylo diskutováno výše), poměrně malý. Pro získání apoformy proteinu Bach1 byla aplikována metoda využívající exprese proteinu bez prekurzorů hemu a následná izolace bez přídavku hemu. Skutečnost, že byla tímto způsobem připravena apoforma byla ověřena pomocí UV-VIS spektroskopie a AAS. Preparáty apoformy Bach1 obsahovaly zanedbatelné množství iontů železa a tedy i molekul hemu.

Nižší výtěžek holoformy Bach1 ve srovnání s výtěžkem apoformy Bach1 potvrdil výsledky předchozí pilotní studie tohoto proteinu [96]. Zdá se, že přítomnost hemu destabilizuje molekulu Bach1. Výskyt podobného jevu byl popsán v rámci studie jiného senzorového proteinu, p53 [101]. Na druhou stranu některé senzorové proteiny, které detekují hem, například HRI, vykazují vyšší strukturní stabilitu v případě interakce s molekulou hemu [69]. Tato skutečnost se v případě HRI projevila prostřednictvím zvýšení výtěžku jeho holoformy ve srovnání s apoformou [69], což je jev přesně opačný k situaci, kterou lze pozorovat u Bach1. Vyšší míra degradace proteinu Bach1 v přítomnosti hemu by mohla být způsobena například vlivem oxidativního stresu, který je schopna tato molekula vyvolat [12]. Na druhou stranu v případě HRI dochází vlivem dosud neznámých mechanismů, které pravděpodobně chrání HRI před možným působením oxidativního stresu, k stabilizaci tohoto proteinu po vazbě hemu. Zdá se tedy, že nelze učinit žádný obecný závěr týkající se vlivu interakce senzorových proteinů, které detekují hem, s molekulou hemu na strukturní stabilitu těchto proteinů.

Vzhledem k relativně nízkým výtěžkům prokaryotické exprese Bach1 je v budoucnu plánováno zjistit míru exprese tohoto proteinu v eukaryotických expresních systémech. V literatuře [102] jsou popsány situace, ve kterých použití eukaryotických expresních systémů (především kvasinkových expresních systémů) vedlo k markantnímu zvýšení míry exprese příslušných rekombinantních proteinů v porovnání s prokaryotickými expresními systémy. Výhodou eukaryotických expresních systémů je možnost zajistit posttranslační modifikace exprimovaných proteinů [103], které by mohly poskytnout protein Bach1 ve fyziologicky relevantnější formě. V rámci této diplomové práce nebyla eukaryotická exprese Bach1 testována z časových důvodů, nicméně byly připraveny expresní plasmidy vhodné pro tuto expresi proteinu Bach1 v savčích expresních systémech. Tyto systémy sice zpravidla nevykazují signifikantně vyšší výtěžky exprese ve srovnání s prokaryotickými systémy, nicméně umožňují produkci proteinů ve vhodnější konformaci, která lépe vypovídá o vlastnostech tohoto proteinu v buňce [102]. Právě tato skutečnost by mohla mít významnou roli v případě proteinu Bach1.

Dále je z literatury patrné, že většina hemových senzorových proteinů má flexibilní charakter [32,104], což velmi komplikuje jejich studium v plnodélkové formě. Řada autorů proto pro studium těchto proteinů využívá jejich různých uměle manipulovaných konstruktů či izolovaných domén, z nichž se následně snaží vyvodit vlastnosti proteinu jako celku [69,105,106]. Nejinak je tomu v případě senzorového proteinu Bach1, který detekuje hem [75,80,82]. V rámci této diplomové práce bylo rozhodnuto zaměřit se na plnodélkovou formu Bach1 s vědomím, že tento fakt bude práci s proteinem komplikovat. Na druhou stranu však závěry učiněné pro takovou formu proteinu nejsou zatíženy arteficiálními chybami, jaké lze občas pozorovat u závěrů studií izolovaných domén senzorových proteinů, které se autoři snaží aplikovat na plnodélkové proteiny [28].

Jedním z klíčových zjištění této diplomové práce bylo, že jedna molekula proteinu Bach1 je schopna interagovat se dvěma molekulami hemu. Tato skutečnost byla potvrzena hned několika různými metodami, jak je detailněji rozebráno v metodice (kapitola 4) a ve výsledcích (kapitola 5) této diplomové práce. Změna směrnic v titracích uvedených na obrázku 16B (strana 73) je dána specifickou interakcí proteinu Bach1 s heminem. Nejprve se specifická interakce heminu s proteinem Bach1 manifestovala při 411 nm. V další fázi, za „bodem ekvivalence“ předpokládáme již nespecifickou interakci, neboť směrnice tohoto děje je podobná směrnici titrace roztoku o složení 20 $mmol.l^{-1}$ Tris, pH 8,0 a 150 $mmol.l^{-1}$ NaCl (viz obrázek 14B, strana 71). Navíc se zdá, že vlnová délka specifické interakce odpovídá oblasti Soretova píku jiných hemových senzorových proteinů [32,69]. Pouze

z těchto výsledků nemůžeme učinit závěry o distálním a proximálním ligandu iontu železa v hemu interagujícím s Bach1, nicméně se zdá, že nalezenému Soretovu píku Bach1 (411 nm) odpovídají komplexy tvořené histidinem a cysteinem [69,107] Následnými experimenty (provedenými a vyhodnocenými naprosto analogicky jako u roztoku Bach1) bylo ověřeno, že na počet molekul heminu, které specificky interagují s Bach1, nemají vliv ani přídavky jednotlivých interakčních partnerů Bach1, tedy MafK-MBP a DNA obsahující MARE úseky. I v přítomnosti těchto partnerů si protein Bach1 tedy zachovává svou schopnost interagovat s heminem. Tato zjištění jsou unikátní, nejsem si vědom žádné doposud publikované studie, která by se vlivem těchto faktorů zabývala. Všechny literární zdroje, z kterých jsem vycházel, se zabývaly pouze izolovaným proteinem Bach1 bez přítomnosti interakčních partnerů [80,81]. Překvapivě byla pozorována schopnost roztoku izolované formy DNA obsahující MARE úseky interagovat s heminem. Pravděpodobně dochází díky vysokému obsahu guaninových bází v této makromolekule k interkalaci heminu do její struktury [19,20]. Zdá se však, že tato interkalace není příliš specifická, pravděpodobně se jedná o interkalaci molekul heminu mezi roviny interagujících bází a navíc v přítomnosti Bach1 nebyla žádná interakce heminu s DNA spektroskopicky pozorována. Z literatury jsou známy i jiné látky s planární strukturou (například ethidium bromid či benzo[a]pyren), které interkalují do struktury DNA [108,109]. Spektrofotometrickou titrací roztoku izolované formy MafK-MBP bylo prokázáno, že tento protein nevykazuje žádné specifické schopnosti interakce s heminem.

Skutečnost, že Bach1 je schopen specificky interagovat s dvěma molekulami heminu byla dále potvrzena využitím reverzní titrace roztoku heminu proteinem Bach1 v jeho apoformě. Potlačením interferujícího vlivu absorbance nespecificky interagujícího heminu s Bach1 na výsledná spektra lze vysvětlit rozdíl vlnové délky Soretova píku stanovené pomocí standardně provedené spektrofotometrické titrace (411 nm) a pomocí reverzní spektrofotometrické titrace (416 nm). Tyto hodnoty jsou v souladu s hodnotou vlnových délek Soretova píku u jiných hemových senzorových proteinů [32,69].

Pro ověření výsledků získaných pomocí UV-VIS spektrofotometrických titrací byla využita metoda AAS a metoda detekce volných molekul hemu využívající pyridin. Metodou AAS bylo ověřeno, že protein Bach1 získaný rekombinantní expresí je přítomen ve své apoformě. Toto zjištění je poměrně překvapivé, neboť bakterie disponují schopností syntézy hemu a vzhledem k nízkému výtěžku proteinu Bach1 by se mohlo stát, že většina jeho molekul bude interagovat s takto vzniklým hemem. Výsledky obou zmíněných metod (tedy

AAS i metody využívající pyridin) potvrzují závěry spektrofotometrických titrací, tedy že protein Bach1 interaguje s dvěma molekulami hemu.

Předběžnou charakterizací proteinu Bach1 pomocí gelové permeační chromatografie, provedené již v rámci předchozí bakalářské práce [96], bylo stanoveno, že se tento protein vyskytuje v připravených preparátech především ve formě homodimeru. Nicméně pro porozumění vlastnostem proteinu Bach1 a rozšíření znalostí o něm, bylo rozhodnuto přistoupit k provedení detailnější analýzy oligomerních stavů proteinu Bach1 v jeho apoformě a holoformě s využitím metody analytické ultracentrifugace. Důležitým zjištěním těchto experimentů byla skutečnost, že zastoupení tetramerní formy Bach1 v preparátu apoformy Bach1 je přibližně 2,5-krát větší než v případě holoformy Bach1, zatímco holoforma Bach1 má ve srovnání s jeho apoformou přibližně čtyřikrát vyšší podíl monomerní formy. Zajímavostí je, že celkový obsah dimerní formy Bach1 je v obou preparátech přibližně stejný. Hem je tedy pravděpodobně zodpovědný za zvýšení podílu monomerní formy Bach1 a ovlivňuje tak rovnováhu mezi jednotlivými oligomerními stavy Bach1 a tím determinuje aktivitu proteinu Bach1 v buňce. Pro interakci Bach1 s DNA, která se děje v případě nízké koncentrace volného hemu, kdy je Bach1 v apoformě, je potřeba, aby vznikl heterodimer složený z proteinů Bach1 a MafK (viz obrázek 5, strana 30). Pokud je však koncentrace volného hemu v buňce zvýšena, vytváří se holoforma Bach1, která se na rozdíl od apoformy Bach1 vyskytuje také v monomerní formě. Tato skutečnost by mohla vysvětlit disociaci heterokomplexu Bach1-MafK z DNA a následné kroky, jak jsou detailně popsány na obrázku 5. Navíc se lze, vzhledem k nižšímu výtěžku holoformy Bach1 ve srovnání s apoformou Bach1, domnívat, že tvorba holoformy Bach1 vede k následné destabilizaci tohoto proteinu. I když mechanismus takového jevu podrobně neznáme, je ve shodě se závěry jiných prací (viz obrázek 5) [79]. Analogický jev byl pozorován u některých dalších hemových senzorových proteinů [69,110] a mohl by představovat společnou vlastnost některých zástupců hemových senzorových proteinů. Kromě pozorované změny relativního zastoupení monomerních a tetramerních forem Bach1 v preparátech jeho apoformy a holoformy byla pomocí analytické ultracentrifugace stanovena taktéž odlišná hodnota sedimentačních koeficientů pro jednotlivé oligomerní formy daných stavů. Srovnání hodnot sedimentačních koeficientů stanovených pro majoritně zastoupenou dimerní formu v obou preparátech Bach1 (6,3 S v případě apoformy, 6,7 S v případě holoformy) naznačuje možnost, že strukturní změny proteinu Bach1 vlivem vazby hemu jsou natolik markantní, že se projeví zvýšením sedimentačního koeficientu. Nicméně nesmíme zapomenout na fakt, že zvýšení molekulové hmotnosti holoformy Bach1 vůči molekulové hmotnosti apoformy Bach1

v důsledku interakce s dvěma molekulami hemu, může mít také vliv na zvýšení sedimentačního koeficientu. Na druhou stranu tento fakt nevysvětluje tak výraznou změnu jeho hodnoty. Vzhledem k vyšší hodnotě sedimentačního koeficientu v případě holoformy Bach1 se zdá být pravděpodobné, že vazba hemu do struktury Bach1 indukuje vznik kompaktnější struktury.

Jelikož je funkce a aktivita některých hemových senzorových proteinů výrazně ovlivněna redoxním stavem iontu železa v hemu [63,111], bylo rozhodnuto provést ověření, zda také protein Bach1 nevykazuje podobné vlastnosti. Toto zjištění by bylo velmi atraktivní, neboť by umožnilo vysvětlit diskrepanci, která v literatuře ohledně počtu molekul hemu vázajících se do struktury Bach1 panuje. Redoxní stav iontu železa v hemu může totiž mít zásadní vliv najeho koordinační schopnosti [111]. V prvotní fázi experimentů prováděných v rámci této diplomové práce byl jako redukční činidlo pro redukci iontu železa v hemu využit dithioničitan sodný. Absorpční vlastnosti tohoto redukčního činidla bohužel interferovaly s absorpčními vlastnostmi studovaného proteinu Bach1 v případě jeho interakce s molekulou hemu. Vzhledem k této interferenci nemohl být dithioničitan pro přípravu redukované formy iontu železa v hemu použit. Bylo proto třeba nalézt jiné vhodné redukční činidlo, které by bylo schopno ovlivňovat redoxní a případně i ligandový stav iontu železa v hemu. Takovým redukčním činidlem se ukázal být sulfid sodný, který ve vodném roztoku poskytuje HS^- ionty, podobně jako sulfan. Hodnota pK_a pro sulfan je totiž přibližně 6,9. Díky této skutečnosti může sulfan za běžného fyziologického pH intracelulární tekutiny většiny buněk (pH přibližně 7,4), disociovat na ion HS^- [33].

Do popředí vědeckého zájmu se v poslední době dostává role plynného sulfanu a její potenciální signalizační funkce v některých živých organismech [58]. Vzhledem k velmi dynamickému vývoji na tomto poli bylo rozhodnuto zjistit, zda není funkce proteinu Bach1 výrazně ovlivněna v přítomnosti sulfidu sodného. Sulfid sodný vykazuje redukční vlastnosti vůči iontu železa v hemu [64]. V rámci optimalizace experimentů zkoumajících vliv sulfidu sodného na hemové senzorové proteiny, bylo rozhodnuto se zpočátku zaměřit na stanovení vlivu sulfidu sodného na diguanylátcyklasovou aktivitu YddV-MBP WT a jeho mutantu YddV-MBP Y43A. Jedná se o prokaryotický protein s poměrně vysokými výtěžky exprese v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) a izolace z nich. Navíc lze vliv sulfidu sodného na jeho aktivitu relativně snadno stanovit pomocí studia kinetiky diguanylátcyklasového procesu. Nebyl prokázán signifikantní rozdíl mezi aktivitou proteinu YddV-MBP WT s iontem železa v hemu ve stavu Fe(II) v důsledku působení sulfidu sodného a ve stavu Fe(III) (nativní forma). Unikátním příspěvkem k popisu funkce proteinu YddV bylo ověření, zda vznik

čistého Fe(III)-SH stavu jeho mutantu YddV-MBP Y43A vlivem sulfidu sodného (tento jev byl detailně popsán již dříve pro izolovanou globinovou doménu YddV Y43A [64]) bude ovlivňovat jeho enzymovou aktivitu. Nicméně ani tento stav neměl výrazný vliv na enzymovou aktivitu YddV.

Následně bylo možno přikročit k vlastnímu experimentu popisujícímu vliv sulfidu sodného na vlastnosti Bach1. Pro tyto účely byla využita reverzní spektrofotometrická titrace proteinu Bach1 v přítomnosti sulfidu sodného heminem. Maximum Soretova píku bylo v absorpčním spektru nalezeno při 432 nm. Jedná se o poměrně výrazný posun oproti oxidované formě iontu železa v hemu, kdy bylo při stejném experimentální uspořádání bez přídavku sulfidu sodného nalezeno maximum Soretova píku při 416 nm. Maximum při 432 nm pravděpodobně odpovídá redukované formě iontu železa v hemu. Posun vlnové délky Soretova píku byl pozorován po redukci iontu železa v hemu interagujícího také s jinými hemovými senzorovými proteiny. Nicméně hodnota vlnové délky tohoto Soretova píku je poměrně variabilní (přibližně v intervalu 390 nm – 450 nm v závislosti na konkrétním proteinu) [32,112]. Také v redukované formě iontu železa v hemu dochází pravděpodobně k interakci dvou molekul hemu s jednou molekulou Bach1.

Závěrem je třeba konstatovat, že výsledky získané v rámci této diplomové práce přinesly nové a zajímavé poznatky týkající se mechanismu funkce proteinu Bach1. Byla provedena detailní analýza interakčních schopností proteinu Bach1 s hemem, která by měla přispět k objasnění diskrepancí uvedených v literatuře [80,81]. Výsledky získané pomocí analytické ultracentrifugace přinesly zásadní poznatky týkající se vlivu interakce Bach1 s hemem na distribuci oligomerních stavů tohoto proteinu. Nicméně ve studiu Bach1 bude potřeba nadále intenzivně pokračovat. Rutinní zavedení eukaryotické exprese Bach1 by mohlo napomoci k získání proteinu Bach1 ve fyziologicky relevantnější formě, případně o vyšším výtěžku a čistotě. Bylo by také velmi zajímavé provést analytickou ultracentrifugaci proteinu Bach1 za přítomnosti různých koncentracích heminu, případně využít dialyzačních experimentů pro stanovení disociační konstanty charakterizující sílu vazby heminu s proteinem Bach1.

7 Závěr

Předkládaná diplomová práce se zabývá charakterizací apoformy a holoformy senzorového proteinu Bach1, který detekuje hem. Cíle stanovené pro tuto diplomovou práci byly naplněny, konkrétně bylo dosaženo následujících výsledků:

- Exprese proteinu Bach1 v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) byla úspěšně provedena pomocí její indukce vlivem přídavku IPTG. Izolace a následná purifikace apoformy i holoformy proteinu Bach1 z buněk *E. coli* BL-21(DE3) byla úspěšně provedena. Bylo získáno 150 µl roztoku apoformy Bach1 o koncentraci 6,2 $mg.ml^{-1}$ a čistotě 80 % a 170 µl roztoku holoformy Bach1 o koncentraci 2,4 $mg.ml^{-1}$ a čistotě 75 %. Výtěžek příslušných forem Bach1 činil 116 µg apoformy Bach1 z 1 l TB média a 51 µg holoformy Bach1 z 1 l TB média. Opakovaně provedené izolace vykazovaly přibližně stejné výtěžky.
- Dále byla provedena optimalizace exprese proteinu Bach1 v buňkách *E. coli* BL-21(DE3). Konkrétně bylo optimalizováno složení expresního média. Pozitivní efekt sorbitolu a betainu monohydrátu na míru exprese proteinu Bach1 nebyl prokázán. Nejvyšší míru exprese Bach1 vykazovaly buňky kultivované v TB médiu.
- Příprava plasmidové DNA vhodné pro expresi proteinu Bach1 v eukaryotických expresních systémech byla také úspěšně provedena. Byl získán roztok plasmidové DNA pTW5/Bach1-Histag o koncentraci 730 $ng.µl^{-1}$ a roztok obsahující pTW5Sec/Bach1-Histag o koncentraci plasmidové DNA 690 $ng.µl^{-1}$
- Bylo zjištěno, že protein Bach1 v homodimerní formě specificky interaguje se dvěma molekulami heminu. Přítomnost interakčních partnerů Bach1 nijak neovlivnila tuto skutečnost.
- Pomocí metody analytické ultracentrifugace byl prokázán vliv přítomnosti hemu na oligomerní stav Bach1. V přítomnosti hemu (tedy v případě holoformy Bach1) je v preparátu Bach1 přítomno signifikantně vyšší zastoupení monomerní formy než v případě apoformy Bach1. Přibližně opačná relace platí pro zastoupení tetramerní formy Bach1. Zastoupení dimerní formy je v obou preparátech Bach1 (tedy apoformě i holoformě) přibližně stejné.
- Změna redoxního stavu iontu železa v hemu pravděpodobně neovlivňuje počet molekul hemu, které specificky interagují s Bach1.

8 Seznam použitých zdrojů

1. Oohora K, Hayashi T. 2014. Hemoprotein-based supramolecular assembling systems. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 19:154–161.
2. Waldron KJ, Rutherford JC, Ford D, Robinson NJ. 2009. Metalloproteins and metal sensing. *Nature*. 460:823–830.
3. Lu Y, Yeung N, Sieracki N, Marshall NM. 2009. Design of functional metalloproteins. *Nature*. 460:855–862.
4. Gozzelino R, Arosio P. 2016. Iron Homeostasis in Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 17:130.
5. Miethke M, Marahiel MA. 2007. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71:413–451.
6. Ganz T, Nemeth E. 2015. Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 15:500–510.
7. Baker HM, Anderson BF, Baker EN. 2003. Dealing with iron: Common structural principles in proteins that transport iron and heme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100:3579–3583.
8. Schütz M, Brugna M, Lebrun E, Baymann F, Huber R, Stetter K-O, Hauska G, Toci R, Lemesle-Meunier D, Tron P, Schmidt C, Nitschke W. 2000. Early Evolution of Cytochrome bc Complexes. *J. Mol. Biol.* 300:663–675.
9. Ponka P. 1999. Cell Biology of Heme. *Am. J. Med. Sci.* 318:241–256.
10. Zhang L. 2011. *Heme biology: the secret life of heme in regulating diverse biological processes*. World Scientific, Singapore ; Hackensack, NJ.
11. Roumenina LT, Rayes J, Lacroix-Desmazes S, Dimitrov JD. 2016. Heme: Modulator of Plasma Systems in Hemolytic Diseases. *Trends Mol. Med.* 22:200–213.
12. Girvan HM, Munro AW. 2013. Heme Sensor Proteins. *J. Biol. Chem.* 288:13194–13203.
13. Sono M, Roach MP, Coulter ED, Dawson JH. 1996. Heme-Containing Oxygenases. *Chem. Rev.* 96:2841–2888.
14. Hanna DA, Harvey RM, Martinez-Guzman O, Yuan X, Chandrasekharan B, Raju G, Outten FW, Hamza I, Reddi AR. 2016. Heme dynamics and trafficking factors revealed by genetically encoded fluorescent heme sensors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113:7539–7544.
15. Leong SA, Ditta GS, Helinski DR. 1982. Heme biosynthesis in Rhizobium. Identification of a cloned gene coding for delta-aminolevulinic acid synthetase from Rhizobium meliloti. *J. Biol. Chem.* 257:8724–8730.
16. Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. 2005. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338:558–567.
17. Knutson MD. 2017. Iron transport proteins: Gateways of cellular and systemic iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* 292:12735–12743.
18. Kumar S, Bandyopadhyay U. 2005. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol. Lett.* 157:175–188.
19. Shinomiya R, Katahira Y, Araki H, Shibata T, Momotake A, Yanagisawa S, Ogura T, Suzuki A, Neya S, Yamamoto Y. 2018. Characterization of Catalytic Activities and Heme Coordination Structures of Heme–DNA Complexes Composed of Some Chemically Modified Hemes and an All Parallel-Stranded Tetrameric G-Quadruplex DNA Formed from d(TTAGGG). *Biochemistry*. 57:5930–5937.
20. Yamamoto Y, Araki H, Shinomiya R, Hayasaka K, Nakayama Y, Ochi K, Shibata T, Momotake A, Ohyama T, Hagihara M, Hemmi H. 2018. Structures and Catalytic Activities of Complexes between Heme and All Parallel-Stranded Monomeric G-Quadruplex DNAs. *Biochemistry*. 57:5938–5948.

21. Aft RL, Mueller GC. 1983. Hemin-mediated DNA strand scission. *J. Biol. Chem.* 258:12069–12072.
22. Pasternack RF, Gibbs EJ, Hoeflin E, Kosar WP, Kubera G, Skowronek CA, Wong NM, Muller-Eberhard U. 1983. Hemin binding to serum proteins and the catalysis of interprotein transfer. *Biochemistry*. 22:1753–1758.
23. Smith LJ, Kahraman A, Thornton JM. 2010. Heme proteins-Diversity in structural characteristics, function, and folding. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 78:2349–2368.
24. Kendrew JC, Bodo G, Dintzis HM, Parrish RG, Wyckoff H, Phillips DC. 1958. A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis. *Nature*. 181:662–666.
25. Garry* DJ, Meeson A, Yan Z, Williams RS. 2000. Life without myoglobin: *Cell. Mol. Life Sci.* 57:896–898.
26. Schneider S, Marles-Wright J, Sharp KH, Paoli M. 2007. Diversity and conservation of interactions for binding heme in b-type heme proteins. *Nat. Prod. Rep.* 24:621.
27. Schechter AN. 2008. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*. 112:3927–3938.
28. Igarashi J, Kitanishi K, Martinkova M, Murase M, Iizuka A, Shimizu T. 2007. The Roles of Thiolate-Heme Proteins, Other Than the P450 Cytochromes, in the Regulation of Heme-Sensor Proteins. *Acta Chim. Slov.*:67–74.
29. Kajimura M, Fukuda R, Bateman RM, Yamamoto T, Suematsu M. 2010. Interactions of Multiple Gas-Transducing Systems: Hallmarks and Uncertainties of CO, NO, and H_2S Gas Biology. *Antioxid. Redox Signal.* 13:157–192.
30. Singh BK, Sharma SR, Singh B. 2010. Antioxidant enzymes in cabbage: Variability and inheritance of superoxide dismutase, peroxidase and catalase. *Sci. Hortic.* 124:9–13.
31. Borisov VB, Gennis RB, Hemp J, Verkhovsky MI. 2011. The cytochrome bd respiratory oxygen reductases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1807:1398–1413.
32. Igarashi J, Kitanishi K, Shimizu T. 2010. Emerging Roles of Heme as a Signal and a Gas-Sensing Site: Heme-Sensing and Gas-Sensing Proteins. *Handb. Porfyrin Sci.* World Scientific Publishing, Hackensack, NJ, USA, pp 399–460.
33. Shimizu T. 2013. Revisit of the Interactions between Hydrogen Sulfide and Heme Proteins. *Curr. Chem. Biol.* 7:207–212.
34. Farhana A, Saini V, Kumar A, Lancaster JR, Steyn AJC. 2012. Environmental Heme-Based Sensor Proteins: Implications for Understanding Bacterial Pathogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* 17:1232–1245.
35. Vermeulen AJ, Bauer CE. 2015. Members of the PpaA/AerR Antirepressor Family Bind Cobalamin. In Zhulin, IB, ed., *J. Bacteriol.* 197:2694–2703.
36. Shimizu T, Huang D, Yan F, Stranava M, Bartosova M, Fojtíková V, Martínková M. 2015. Gaseous O_2, NO, and CO in Signal Transduction: Structure and Function Relationships of Heme-Based Gas Sensors and Heme-Redox Sensors. *Chem. Rev.* 115:6491–6533.
37. Tagliabue L, Antoniani D, Maciag A, Bocci P, Raffaelli N, Landini P. 2010. The diguanylate cyclase YddV controls production of the exopolysaccharide poly-N-acetylglucosamine (PNAG) through regulation of the PNAG biosynthetic pgaABCD operon. *Microbiol. Read. Engl.* 156:2901–2911.
38. Méndez-Ortiz MM, Hyodo M, Hayakawa Y, Membrillo-Hernández J. 2006. Genome-wide Transcriptional Profile of *Escherichia coli* in Response to High Levels of the Second Messenger 3′,5′-Cyclic Diguanylic Acid. *J. Biol. Chem.* 281:8090–8099.
39. Martínková M, Kitanishi K, Shimizu T. 2013. Heme-based Globin-coupled Oxygen Sensors: Linking Oxygen Binding to Functional Regulation of Diguanylate Cyclase, Histidine Kinase, and Methyl-accepting Chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 288:27702–27711.

40. Gophna U, Barlev M, Seijffers R, Oelschlager TA, Hacker J, Ron EZ. 2001. Curli fibers mediate internalization of Escherichia coli by eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 69:2659–2665.
41. Wright KJ, Seed PC, Hultgren SJ. 2007. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic Escherichia coli depends on type 1 pili. *Cell. Microbiol.* 9:2230–2241.
42. Galperin MY, Higdon R, Kolker E. 2010. Interplay of heritage and habitat in the distribution of bacterial signal transduction systems. *Mol. Biosyst.* 6:721.
43. Whiteley CG, Lee D-J. 2015. Bacterial diguanylate cyclases: Structure, function and mechanism in exopolysaccharide biofilm development. *Biotechnol. Adv.* 33:124–141.
44. Tarnawski M, Barends TRM, Schlichting I. 2015. Structural analysis of an oxygen-regulated diguanylate cyclase. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 71:2158–2177.
45. Kitanishi K, Kobayashi K, Kawamura Y, Ishigami I, Ogura T, Nakajima K, Igarashi J, Tanaka A, Shimizu T. 2010. Important Roles of Tyr43 at the Putative Heme Distal Side in the Oxygen Recognition and Stability of the Fe(II)−O $_2$ Complex of YddV, a Globin-Coupled Heme-Based Oxygen Sensor Diguanylate Cyclase. *Biochemistry*. 49:10381–10393.
46. Nakajima K, Kitanishi K, Kobayashi K, Kobayashi N, Igarashi J, Shimizu T. 2012. Leu65 in the heme distal side is critical for the stability of the Fe(II)–O2 complex of YddV, a globin-coupled oxygen sensor diguanylate cyclase. *J. Inorg. Biochem.* 108:163–170.
47. Green J, Crack JC, Thomson AJ, LeBrun NE. 2009. Bacterial sensors of oxygen. *Curr. Opin. Microbiol.* 12:145–151.
48. Tuckerman JR, Gonzalez G, Sousa EHS, Wan X, Saito JA, Alam M, Gilles-Gonzalez M-A. 2009. An Oxygen-Sensing Diguanylate Cyclase and Phosphodiesterase Couple for c-di-GMP Control. *Biochemistry*. 48:9764–9774.
49. Marletta MA. 1994. Nitric oxide synthase: Aspects concerning structure and catalysis. *Cell*. 78:927–930.
50. Montfort WR, Wales JA, Weichsel A. 2017. Structure and Activation of Soluble Guanylyl Cyclase, the Nitric Oxide Sensor. *Antioxid. Redox Signal.* 26:107–121.
51. Lundberg JO, Gladwin MT, Weitzberg E. 2015. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14:623–641.
52. Fritz BG, Roberts SA, Ahmed A, Breci L, Li W, Weichsel A, Brailey JL, Wysocki VH, Tama F, Montfort WR. 2013. Molecular Model of a Soluble Guanylyl Cyclase Fragment Determined by Small-Angle X-ray Scattering and Chemical Cross-Linking. *Biochemistry*. 52:1568–1582.
53. Arora DP, Hossain S, Xu Y, Boon EM. 2015. Nitric Oxide Regulation of Bacterial Biofilms. *Biochemistry*. 54:3717–3728.
54. Boon EM, Huang SH, Marletta MA. 2005. A molecular basis for NO selectivity in soluble guanylate cyclase. *Nat. Chem. Biol.* 1:53–59.
55. Martin E, Berka V, Bogatenkova E, Murad F, Tsai A-L. 2006. Ligand Selectivity of Soluble Guanylyl Cyclase: EFFECT OF THE HYDROGEN-BONDING TYROSINE IN THE DISTAL HEME POCKET ON BINDING OF OXYGEN, NITRIC OXIDE, AND CARBON MONOXIDE. *J. Biol. Chem.* 281:27836–27845.
56. Gullotta F, di Masi A, Coletta M, Ascenzi P. 2012. CO metabolism, sensing, and signaling. *BioFactors*. 38:1–13.
57. Banerjee R, Zou C-G. 2005. Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine-beta-synthase: a PLP-dependent hemesensor protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 433:144–156.
58. Kabil O, Banerjee R. 2010. Redox Biochemistry of Hydrogen Sulfide. *J. Biol. Chem.* 285:21903–21907.

59. Cuevasanta E, Möller MN, Alvarez B. 2017. Biological chemistry of hydrogen sulfide and persulfides. *Arch. Biochem. Biophys.* 617:9–25.
60. Pietri R, Román-Morales E, López-Garriga J. 2011. Hydrogen sulfide and hemeproteins: knowledge and mysteries. *Antioxid. Redox Signal.* 15:393–404.
61. Mishanina TV, Libiad M, Banerjee R. 2015. Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways. *Nat. Chem. Biol.* 11:457–464.
62. Takahashi H, Sekimoto M, Tanaka M, Tanaka A, Igarashi J, Shimizu T. 2012. Hydrogen sulfide stimulates the catalytic activity of a heme-regulated phosphodiesterase from Escherichia coli (Ec DOS). *J. Inorg. Biochem.* 109:66–71.
63. Yan F, Fojtikova V, Man P, Stranava M, Martínková M, Du Y, Huang D, Shimizu T. 2015. Catalytic enhancement of the heme-based oxygen-sensing phosphodiesterase EcDOS by hydrogen sulfide is caused by changes in heme coordination structure. *BioMetals*. 28:637–652.
64. Fojtikova V, Bartosova M, Man P, Stranava M, Shimizu T, Martinkova M. 2016. Effects of hydrogen sulfide on the heme coordination structure and catalytic activity of the globin-coupled oxygen sensor AfGcHK. *BioMetals*. 29:715–729.
65. Zhang L, Guarente L. 1995. Heme binds to a short sequence that serves a regulatory function in diverse proteins. *EMBO J.* 14:313–320.
66. A. Iizuka, Igarashi J, Shimizu T. 2007. Abstract for the 15th International Conference on Cytochromes P450 - Biochemistry, Biophysics and Functional Genomics. Bled, Slovenia, p 182.
67. Shimizu T, Hikage N, Kitanishi K, Murase M, Iizuka A, Ishikawa S, Ishitsuka K, Saiful I, Yamauchi A, Tanaka A, Martinkova M, Igarashi J, Sagami I. 2007. Abstract for the 15th International Conference on Cytochromes P450 - Biochemistry, Biophysics and Functional Genomics. Bled, Slovenia, pp 31–38.
68. Shimizu T. 2012. Binding of cysteine thiolate to the Fe(III) heme complex is critical for the function of heme sensor proteins. *J. Inorg. Biochem.* 108:171–177.
69. Miksanova M, Igarashi J, Minami M, Sagami I, Yamauchi S, Kurokawa H, Shimizu T. 2006. Characterization of heme-regulated eIF2alpha kinase: roles of the N-terminal domain in the oligomeric state, heme binding, catalysis, and inhibition. *Biochemistry*. 45:9894–9905.
70. Hargrove MS, Singleton EW, Quillin ML, Ortiz LA, Phillips GN, Olson JS, Mathews AJ. 1994. His64(E7)-->Tyr apomyoglobin as a reagent for measuring rates of hemin dissociation. *J. Biol. Chem.* 269:4207–4214.
71. Igarashi J, Murase M, Iizuka A, Pichierri F, Martinkova M, Shimizu T. 2008. Elucidation of the Heme Binding Site of Heme-regulated Eukaryotic Initiation Factor 2 Kinase and the Role of the Regulatory Motif in Heme Sensing by Spectroscopic and Catalytic Studies of Mutant Proteins. *J. Biol. Chem.* 283:18782–18791.
72. Yang J, Ishimori K, O'Brian MR. 2005. Two heme binding sites are involved in the regulated degradation of the bacterial iron response regulator (Irr) protein. *J. Biol. Chem.* 280:7671–7676.
73. Watanabe-Matsui M, Matsumoto T, Matsui T, Ikeda-Saito M, Muto A, Murayama K, Igarashi K. 2015. Heme binds to an intrinsically disordered region of Bach2 and alters its conformation. *Arch. Biochem. Biophys.* 565:25–31.
74. Zhou Y, Wu H, Zhao M, Chang C, Lu Q. 2016. The Bach Family of Transcription Factors: A Comprehensive Review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 50:345–356.
75. Igarashi K, Hoshino H, Muto A, Suwabe N, Nishikawa S, Nakauchi H, Yamamoto M. 1998. Multivalent DNA binding complex generated by small Maf and Bach1 as a possible biochemical basis for beta-globin locus control region complex. *J. Biol. Chem.* 273:11783–11790.

76. Wei X, Guo J, Li Q, Jia Q, Jing Q, Li Y, Zhou B, Chen J, Gao S, Zhang X, Jia M, Niu C, Yang W, Zhi X, Wang X, Yu D, Bai L, Wang L, Na J, Zou Y, Zhang J, Zhang S, Meng D. 2019. Bach1 regulates self-renewal and impedes mesendodermal differentiation of human embryonic stem cells. *Sci. Adv.* 5:eaau7887.
77. Blouin J-L, Duriaux Saïl G, Guipponi M, Rossier C, Pappasavas M-P, Antonarakis SE. 1998. Isolation of the human BACH1 transcription regulator gene, which maps to chromosome 21q22.1. *Hum. Genet.* 102:282–288.
78. 2019. Uniprot. Dostupné z: http://www.uniprot.org/uniprot/P97302. Stav k 2.5. 2019.
79. Igarashi K, Watanabe-Matsui M. 2014. Wearing red for signaling: the heme-bach axis in heme metabolism, oxidative stress response and iron immunology. *Tohoku J. Exp. Med.* 232:229–253.
80. Hira S, Tomita T, Matsui T, Igarashi K, Ikeda-Saito M. 2007. Bach1, a heme-dependent transcription factor, reveals presence of multiple heme binding sites with distinct coordination structure. *IUBMB Life*. 59:542–551.
81. Ogawa K, Sun J, Taketani S, Nakajima O, Nishitani C, Sassa S, Hayashi N, Yamamoto M, Shibahara S, Fujita H, Igarashi K. 2001. Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *EMBO J.* 20:2835–2843.
82. Suzuki H, Tashiro S, Hira S, Sun J, Yamazaki C, Zenke Y, Ikeda-Saito M, Yoshida M, Igarashi K. 2004. Heme regulates gene expression by triggering Crm1-dependent nuclear export of Bach1. *EMBO J.* 23:2544–2553.
83. Motohashi H, O'Connor T, Katsuoka F, Engel JD, Yamamoto M. 2002. Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene*. 294:1–12.
84. Katsuoka F, Yamamoto M. 2016. Small Maf proteins (MafF, MafG, MafK): History, structure and function. *Gene*. 586:197–205.
85. Igarashi K, Sun J. 2006. The Heme-Bach1 Pathway in the Regulation of Oxidative Stress Response and Erythroid Differentiation. *Antioxid. Redox Signal.* 8:107–118.
86. Yoshida C, Tokumasu F, Hohmura KI, Bungert J, Hayashi N, Nagasawa T, Engel JD, Yamamoto M, Takeyasu K, Igarashi K. 1999. Long range interaction of cis-DNA elements mediated by architectural transcription factor Bach1. *Genes Cells*. 4:643–655.
87. Zenke-Kawasaki Y, Dohi Y, Katoh Y, Ikura T, Ikura M, Asahara T, Tokunaga F, Iwai K, Igarashi K. 2007. Heme Induces Ubiquitination and Degradation of the Transcription Factor Bach1. *Mol. Cell. Biol.* 27:6962–6971.
88. Spikes JD. 1975. PORPHYRINS AND RELATED COMPOUNDS AS PHOTODYNAMIC SENSITIZERS. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 244:496–508.
89. Nienhaus K, Nienhaus GU. 2005. Probing Heme Protein–Ligand Interactions by UV/Visible Absorption Spectroscopy. *Protein-Ligand Interact.* 305, Humana Press, New Jersey, pp 215–242.
90. Sinclair PR, Gorman N, Jacobs JM. 1999. Measurement of Heme Concentration. *Curr. Protoc. Toxicol.* 00:8.3.1-8.3.7.
91. Welz B. 2010. *Atomic absorption spectrometry*.
92. Opekar F, Jelínek I, Rychlovský P, Plzák Z. 2010. *Základní analytická chemie*. Univerzita Karlova v Praze, Praha.
93. Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. 2012. *Practical HPLC Method Development*. John Wiley & Sons, New York, NY. [cited 18 March 2019]. Available from http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:101:1-201412164673.
94. Studier FW, Moffatt BA. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189:113–130.

95. 2019. SnapGene. Dostupné z: https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/pet_and_duet_vectors_(novagen)/pET-21c(+)/. Stav k 2.5. 2019.
96. Vávra J. 2017. Příprava plazmidu, exprese, izolace a charakterizace hemového senzorového proteinu Bach1.
97. Poláchová E. 2014. Optimalizace expresního systému HEK293 buněčné linie pomocí regulace buněčného cyklu a apoptózy.
98. Slavata L. 2013. Příprava plazmidů pro expresi interleukin 2- fúzní monoklonální protilátky.
99. Lebowitz J, Lewis MS, Schuck P. 2009. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. *Protein Sci.* 11:2067–2079.
100. Hintze KJ, Katoh Y, Igarashi K, Theil EC. 2007. Bach1 Repression of Ferritin and Thioredoxin Reductase1 Is Heme-sensitive in Cells and in Vitro and Coordinates Expression with Heme Oxygenase1, beta-Globin, and NADP(H) Quinone (Oxido) Reductase1. *J. Biol. Chem.* 282:34365–34371.
101. Shen J, Sheng X, Chang Z, Wu Q, Wang S, Xuan Z, Li D, Wu Y, Shang Y, Kong X, Yu L, Li L, Ruan K, Hu H, Huang Y, Hui L, Xie D, Wang F, Hu R. 2014. Iron Metabolism Regulates p53 Signaling through Direct Heme-p53 Interaction and Modulation of p53 Localization, Stability, and Function. *Cell Rep.* 7:180–193.
102. Verma R, Boleti E, George AJT. 1998. Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *J. Immunol. Methods*. 216:165–181.
103. Rai M, Padh H. 2001. Expression systems for production of heterologous proteins. *Curr. Sci.* 80:1121–1128.
104. Stranava M, Martínek V, Man P, Fojtikova V, Kavan D, Vaněk O, Shimizu T, Martinkova M. 2016. Structural characterization of the heme-based oxygen sensor, *Af* GcHK, its interactions with the cognate response regulator, and their combined mechanism of action in a bacterial two-component signaling system: Hydrogen-Deuterium Exchange Study on Globin-Coupled Histidine Kinase. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 84:1375–1389.
105. Stranava M, Man P, Skálová T, Kolenko P, Blaha J, Fojtikova V, Martínek V, Dohnálek J, Lengalova A, Rosůlek M, Shimizu T, Martínková M. 2017. Coordination and redox state–dependent structural changes of the heme-based oxygen sensor *Af* GcHK associated with intraprotein signal transduction. *J. Biol. Chem.* 292:20921–20935.
106. Monson EK, Weinstein M, Ditta GS, Helinski DR. 1992. The FixL protein of Rhizobium meliloti can be separated into a heme-binding oxygen-sensing domain and a functional C-terminal kinase domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:4280–4284.
107. Koudo R, Kurokawa H, Sato E, Igarashi J, Uchida T, Sagami I, Kitagawa T, Shimizu T. 2005. Spectroscopic characterization of the isolated heme-bound PAS-B domain of neuronal PAS domain protein 2 associated with circadian rhythms: Spectra of PAS-B of NPAS2. *FEBS J.* 272:4153–4162.
108. Meehan T, Gamper H, Becker JF. 1982. Characterization of reversible, physical binding of benzo[a]pyrene derivatives to DNA. *J. Biol. Chem.* 257:10479–10485.
109. Long EC, Barton JK. 1990. On demonstrating DNA intercalation. *Acc. Chem. Res.* 23:271–273.
110. Burns JL, Douglas Deer D, Weinert EE. 2014. Oligomeric state affects oxygen dissociation and diguanylate cyclase activity of globin coupled sensors. *Mol BioSyst*. 10:2823–2826.
111. Aono S. 2003. Biochemical and Biophysical Properties of the CO-Sensing Transcriptional Activator CooA. *Acc. Chem. Res.* 36:825–831.

112. Igarashi J, Sato A, Kitagawa T, Yoshimura T, Yamauchi S, Sagami I, Shimizu T. 2004. Activation of Heme-regulated Eukaryotic Initiation Factor 2α Kinase by Nitric Oxide Is Induced by the Formation of a Five-coordinate NO-Heme Complex: OPTICAL ABSORPTION, ELECTRON SPIN RESONANCE, AND RESONANCE RAMAN SPECTRAL STUDIES. *J. Biol. Chem.* 279:15752–15762.