

**Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a mikrobiologie**



# **Elongační faktor EF-Tu Funkce a termostabilita domén**

Disertační práce

**Hana Šanderová**

*Specializace:* Molekulární a buněčná biologie, genetiky a virologie

*Školitel:* Prof. MUDr. Jiří Jonák, DrSc.  
Oddělení genové exprese, Ústav molekulární genetiky AV ČR

Praha 2008

## Souhrn disertační práce

---

Bakteriální elongační faktor Tu (EF-Tu) je již po desetiletí podrobně studován pro svou klíčovou roli v proteosyntéze. Je to modelová multifunkční GTP-bílkovina. Tato bílkovina je též v centru zájmu, protože představuje vhodný cíl pro nová antibiotika. Kromě toho jsou bílkoviny EF-Tu díky vysoké homologii ve struktuře a funkci vhodné pro studium evolučních vztahů mezi organismy a pro zkoumání strukturních vlastností, které podmiňují adaptační mechanismy k různým životním podmínkám. Všechny známé bílkoviny EF-Tu jsou složeny ze tří domén, a proto jsou vhodnými modelovými bílkovinami pro zkoumání architektury uspořádní domén v bílkovinách.

Jedním z hlavních výzkumných projektů na Oddělení genové exprese v Ústavu molekulární genetiky AV ČR, kde jsem vypracovala svou disertační práci, bylo studium primární struktury, regulace transkripce a regulace funkcí bakteriálního elongačního faktoru Tu z Gram pozitivní termofilní bakterie *Bacillus stearothermophilus* a z Gram negativní mezofilní bakterie *Escherichia coli*.

V této práci jsme se zabývali vztahem struktury a funkce mezi bílkovinami EF-Tu a jejich doménami. Vliv domén byl doposud většinou zkoumán pomocí zkrácených forem EF-Tu, které postrádaly jednu nebo dvě domény bílkoviny. My jsme se rozhodli studovat vlastnosti jednotlivých domén v rámci intaktních třídoménových bílkovin EF-Tu (za použití chimerních bílkovin složených z různých kombinací domén EF-Tu z různých organismů) a porovnat je se samotnou doménou 1 (G-doménou).

Zabývala jsem se dvěma projekty:

### **1. Zkoumání vlivu jednotlivých domén bílkovin EF-Tu z *E. coli* a *B. stearothermophilus* na základní funkce EF-Tu, a to na vazbu GDP a GTP, GTPázovou aktivitu, a na termostabilitu.**

Ukázali jsme, že (i) G-doména a EF-Tu z *B. stearothermophilus* vážou GDP a GTP s afinitami v nanomolární a submikromolární oblasti, které jsou shodné s afinitami EF-Tu z *E. coli*. Naopak, G-doména z *E. coli* ztratila rozdílnou afinitu ke GDP a GTP, typickou pro intaktní EF-Tu, a vážala oba nukleotidy s nižšími, mikromolekulárními afinitami. V *E. coli* je přítomnost všech tří domén nutná pro dosažení vysoké a rozdílné afinity ke GDP a GTP. Naopak, již samotná G-doména z *B. stearothermophilus* má ke GDP a GTP vysoké a rozdílné afinity.

(ii) Izolované katalytické G-domény z obou organismů vykazovaly ve svých optimálních teplotách podobnou GTPázovou aktivitu. Nekatalytické domény 2+3 ze zkoumaných bílkovin

EF-Tu nicméně ovlivňovaly GTPázovou aktivitu G-domén rozdílně, v závislosti na svém původu. Domény 2+3 z EF-Tu z *E. coli* inhibovaly GTPázovou aktivitu G-domény z *E. coli*, zatímco domény 2+3 z EF-Tu z *B. stearothermophilus* stimulovaly GTPázu G-domény z *B. stearothermophilus*.

(iii) Termostabilita obou EF-Tu byla výsledkem vzájemných interakcí mezi G-doménou a doménami 2+3. G-domény nastavovaly základní úroveň termostability obou EF-Tu. Domény 2+3 dále stabilizovaly  $\alpha$ -helikální oblasti G-domén a tím i jejich funkce na úroveň teplot shodných s růstovými teplotními optimy obou organismů.

## **2. Charakterizace prvků termostability G-domény z *B. stearothermophilus* srovnávací analýzou s G-doménou z *B. subtilis***

Ukázali jsem, že 12 aminokyselinových zbytků na N-konci G-domény má důležitou roli v termostabilitě této bílkoviny z *B. stearothermophilus*. Naše experimenty dále ukázaly, že termostabilizující efekt N-konce by mohl být způsoben stabilizací efektorové oblasti důležité pro základní funkce proteinu. Vliv N-konce byl také významný pro termostabilitu tří-doménového EF-Tu.

Naše výsledky přispěly k pochopení uspořádání domén v hojně se vyskytujících bílkovinách - elongačních faktorech EF-Tu. Pomocí systematické analýzy jsme ukázali vliv domén EF-Tu na jeho funkce a termostabilitu. Výsledky získané během mého PhD studia byly prezentovány v pěti člancích, několika přednáškách a posterech na mezinárodních konferencích.