

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Lukrécie Sophie Vojáčková

**Příprava a pilotní charakterizace přímého
kyslíkového senzoru z bakterie *E. coli* (*EcDOS*)**

Preparation and preliminary characterization of a direct oxygen
sensor from *E. coli* (*EcDOS*)

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

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

Praha 2020

Prohlášení:

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

V Praze dne 15. 06. 2020

.....
Lukrécie Sophie Vojáčková

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce doc. RNDr. Markétě Martínkové, Ph.D. za profesionální vedení, cenné rady, čas a podporu. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Alžbětě Lengálové za skvělý pedagogický přístup a pomoc při provedení experimentální části mé práce. Také bych ráda poděkovala doc. RNDr. Václavu Martínkovi, Ph.D. za cenné rady a proškolení v HPLC. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat i své rodině.

Abstrakt

Hemové sensorové proteiny mají významnou funkci při regulaci několika procesů, mezi které patří regulace genové exprese a enzymové aktivity. Hemové sensorové proteiny se mohou dělit na ty, které detekují hem a na ty, které detekují plyny. Tato práce byla zaměřena na hemové sensorové proteiny, které detekují plyny. Důraz byl kladen na hemový sensorový protein, který detekuje kyslík z bakterie *Escherichia coli* s označením *EcDOS*. Byla uskutečněna transformace buněk *E. coli* BL-21 (DE3) prostřednictvím plasmidu pET-28a(+)/*EcDOS* a následně byla provedena exprese proteinu *EcDOS*. Hemoprotein byl poté izolován a purifikován. Bylo zjištěno, že finální preparát proteinu *EcDOS* je plně enzymově aktivní. *EcDOS* vykazuje fosfodiesterasovou aktivitu, tj. katalyzuje přeměnu c-di-GMP na Dos. Testování enzymové aktivity proteinu *EcDOS* proběhlo v jeho oxidované i redukované formě iontu železa hemu. Součástí této bakalářské práce bylo také zkoumání vlivu potenciálních inhibitorů hemových sensorových proteinů. V případě testovaných látek, Artesunate a MSU-39446 (HC106), nebyl za zvolených podmínek prokázán žádný vliv na enzymovou aktivitu *EcDOS*.

Klíčová slova: hem, hemové sensorové proteiny, kyslíkový senzor, přenos signálu

Abstract

Heme sensor proteins play an important role in the regulation of processes, including the regulation of gene expression and enzyme activity. Heme sensor proteins can be divided into two groups – heme-responsive sensors and heme-based gas sensors. This thesis is focused on the heme-based gas sensors, namely on the heme-based O₂ sensors from the bacterium *Escherichia coli* (*EcDOS*). Transformation of *E. coli* BL-21 (DE3) cells by plasmid pET-28a(+)/*EcDOS* was followed by *EcDOS* protein expression, isolation and purification. It was found that the isolated protein *EcDOS* is fully enzymatically active showing phosphodiesterase activity, i.e. it catalyzes the conversion of c-di-GMP to l-di-GMP. The enzyme was active in both its tested states, namely oxidized and reduced form of the heme iron ion in its sensing domain. Another part of this bachelor thesis was to investigate the effects of potential inhibitors of heme sensor proteins. Under chosen conditions, the tested compounds, Artesunate and MSU-39446 (HC106), haven't shown any effects on the enzymatic activity of *EcDOS*.

[IN CZECH]

Key words: heme, heme sensor proteins, oxygen sensors, signal transduction

[IN CZECH]

Obsah

Abstrakt	6
Abstract	7
Obsah.....	8
Seznam zkratk a symbolů	9
1 Teoretický úvod	11
1.1 Charakteristika hemoproteinů	11
1.1.1 Nejdůležitější hemoproteiny	12
1.2 Hemové sensorové proteiny	13
1.2.1 Hemové sensorové proteiny, které detekují hem.....	15
1.2.1.1 Charakteristické vlastnosti hemových sensorových proteinů, které detekují hem.....	15
1.2.1.1.1 Thiolát jako vazebné místo hemu	15
1.2.1.1.2 Hem regulační motiv nebo CP motiv.....	15
1.2.1.1.3 Rychlost disociace hemu.....	16
1.2.1.1.4 Vazba hemu závislá na změně redoxního stavu železa	16
1.2.1.1.5 Proteinová flexibilita a plasticita.....	17
1.2.1.2 Hemem regulovaný inhibitor	18
1.2.2 Hemové sensorové proteiny, které detekují plyny	20
1.2.2.1 Hemové sensorové proteiny, které detekují kyslík.....	20
1.2.2.1.1 PAS doména	21
1.2.2.1.1.1 Přímý kyslíkový senzor s fosfodiesterasovou aktivitou z <i>E. coli</i> (<i>EcDOS</i>).....	21
1.2.2.1.1.2 GAF doména.....	24
1.2.2.1.1.3 Globinová doména	25
1.2.2.2 Hemové sensorové proteiny, které detekují oxid dusnatý	25
1.2.2.3 Hemové sensorové proteiny, které detekují oxid uhelnatý	26
2 Cíle bakalářské práce	27
3 Materiál a metody	29
3.1 Použité přístroje.....	29
3.2 Použité chemikálie	30
3.3 Použité metody.....	32
3.3.1 Příprava roztoků a médií.....	32
3.3.2 Transformace buněk <i>E. coli</i> BL-21 (DE3).....	33
3.3.3 Exprese proteinu <i>EcDOS</i>	33
3.3.4 Izolace proteinu <i>EcDOS</i> z buněk <i>E. coli</i> BL-21(DE3).....	34
3.3.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinu <i>EcDOS</i>	36
3.3.6 Polyakrylamidová elektroforéza v prostředí dodecylsírany sodného	37
3.3.7 Vysokoučinná kapalinová chromatografie	40
4 Výsledky	43
4.1 Transformace buněk <i>E. coli</i> BL-21 (DE3) plasmidem pET-28a(+)/ <i>EcDOS</i>	43
4.2 Exprese proteinu <i>EcDOS</i>	44
4.3 Izolace proteinu <i>EcDOS</i>	45
4.4 Testování enzymové aktivity proteinu <i>EcDOS</i>	47
4.5 Vliv potenciálních inhibitorů.....	49
5 Diskuze.....	53
6 Závěr	59
Seznam použité literatury	61

Seznam zkratk a symbolů

AfGcHK	histidinkinasa s globinovou strukturou sensorové domény z <i>Anaeromyxobacter sp.</i> Fw 109-5
c-di-GMP	cyklický bis-(3',5')-guanosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosin-3',5'-monofosfát
CooA	transkripční faktor bakterie <i>Rhodospirillum rubrum</i>
DMSO	dimethylsulfoxid
DosS	hemový sensorový protein, který detekuje kyslík z bakterie <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a obsahuje GAF sensorovou doménu, funkční doména má histidinkinasovou aktivitu
DosT	kyslíkový sensor z bakterie <i>Mycobacterium tuberculosis</i> obsahující GAF doménu a funkční doménu s histidinkinasovou aktivitou
EAL motiv	část funkční domény přímého kyslíkového senzoru s fosfodiesterasovou aktivitou z <i>Escherichia coli</i>
EcDOS	přímý kyslíkový sensor s fosfodiesterasovou aktivitou z bakterie <i>Escherichia coli</i> , který obsahuje PAS doménu
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eIF2	eukaryotní translační iniciační faktor 2
eIF2 α	α podjednotka eukaryotního translačního iniciačního faktoru 2
FixL	hemový sensorový protein, který detekuje kyslík s histidinkinasovou aktivitou bakterie <i>Rhizobium meliloti</i> nebo <i>Sinorhizobium meliloti</i> , obsahuje PAS doménu
GAF	strukturní motiv prostorového uspořádání proteinů, akronym „cGMP-specific and-stimulated phosphodiesterase“, „adenylate cyclase“ a „ <i>E. coli</i> formate hydrogen lyase transcription activator“
GGDEF motiv	část funkční domény přímého kyslíkového senzoru s fosfodiesterasovou aktivitou z <i>Escherichia coli</i>
GTP	guanosin-5'-trifosfát
H-NOX	strukturní motiv hemové sensorové domény, která detekuje oxid dusnatý, z anglického „heme-nitric oxide/oxygen binding domain/protein“

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRI	hemem regulovaný inhibitor, hemem regulovaná kinasa eukaryotního iniciačního faktoru 2α
HRM	hem regulační motiv
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid
LB agar	Luria Broth agar
LB médium	Luria Broth médium
l-di-GMP	linearizovaná forma cyklického bis-(3',5')-guanosinmonofosfátu
M	$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
mRNA	mediátorová RNA
OD ₆₀₀	optická denzita při 600 nm
PAS	strukturní motiv prostorového uspořádání proteinů, akronym „ <i>Drosophila</i> period clock protein“, „vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ a „ <i>Drosophila</i> single minded protein“
PAS-A	senzorová doména (předcházející PAS-B) přímého kyslíkového senzoru s fosfodiesterasovou aktivitou z <i>Escherichia coli</i>
PAS-B	senzorová doména (následující po PAS-A) přímého kyslíkového senzoru s fosfodiesterasovou aktivitou z <i>Escherichia coli</i>
RPM	otáčky za minutu
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza v prostředí dodecylsíranu sodného
sGC	rozpustná guanylátcyklasa
TB médium	Terrific Broth médium
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	objemová procenta
w/v	hmotnostní procenta
YddV	diguanylátcyklasa s globinovou doménou z bakterie <i>Escherichia coli</i>

1 Teoretický úvod

Hem je důležitý kofaktor řady proteinů vyskytujících se v eukaryotních i prokaryotních buňkách. Z celé velké skupiny hemoproteinů se tato bakalářská práce zaměřila na hemové sensorové proteiny. Ty mají významnou funkci při regulaci několika procesů, mezi které patří regulace genové exprese a enzymové aktivity. Hemové sensorové proteiny se mohou dále dělit na ty, které detekují hem a na ty, které detekují plyny. Velkou výzvou současného vědeckého bádání je pochopení mechanismu přenosu signálu u těchto sensorových proteinů. Taková znalost by nám pak umožnila terapeuticky zasáhnout sensorové proteiny a pomocí inhibitoru nebo aktivátoru změnit jejich vlastnosti. Tato práce byla zaměřena na hemové sensorové proteiny, které detekují plyny. Z této skupiny byl vybrán modelový zástupce, konkrétně kyslíkový senzor s fosfodiesterasou aktivitou z bakterie *Escherichia coli* s označením *EcDOS*. Záměrem bylo připravit modelový protein rekombinantní expresí ve vysoce purifikovaném stavu tak, aby se mohla testovat jeho enzymová aktivita a sledovat vliv potenciálních inhibitorů. Od tohoto výzkumu si slibujeme příspěvek pochopení fungování tohoto modelového systému.

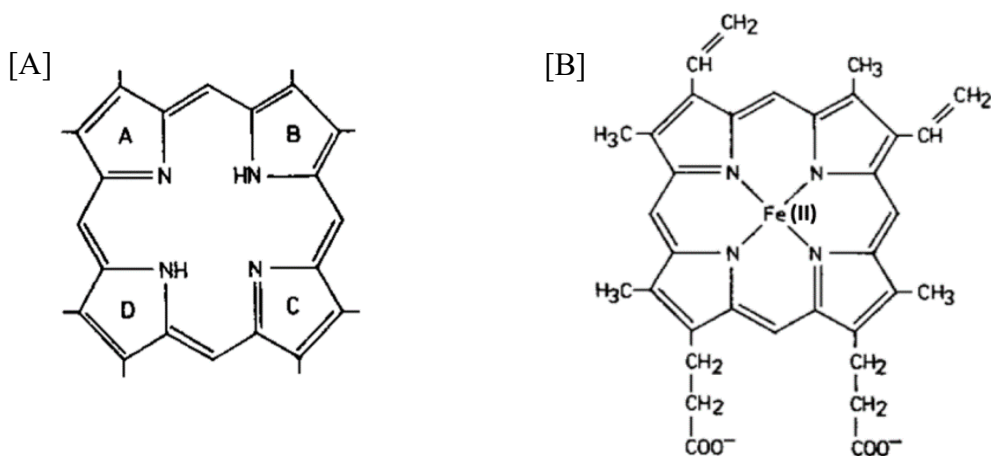
1.1 Charakteristika hemoproteinů

Hemoproteiny jsou proteiny, jejichž hlavní složkou je molekula hemu, který je zde prostetickou skupinou. Hem je cyklický tetrapyrrol. Tetrapyrroly se skládají ze čtyř pyrrolových jader spojených v jedné rovině v α -polohách methynovými můstky [1]. Tyto sloučeniny se nazývají porfíny [2].

Jsou-li porfíny substituovány uhlíkovými řetězci ve všech β -polohách pyrrolových jader, vznikají jeho deriváty zvané porfyriny (vizte obrázek č. 1[A], strana č. 12). Název porfyrinů se skládá z předpony a čísla umístěného za názvem. Předpona udává charakter substituentů a římská číslice vyjadřuje jejich rozložení na makrocyklu. Dle navázaných substituentů a jejich rozložení na porfyrinu lze rozeznat několik izomerů [2].

V hemoproteinech se vyskytuje pouze asymetrický izomer protoporfyrin IX. Z protoporfyrinu IX dále vzniká ferroporfyrin IX (detaily ohledně koordinace iontu železa vizte další odstavec), který bývá obecně označován jako hem [2]. Hem patří mezi jeden z nejstabilnějších porfyrinových komplexů. Molekula hemu obsahuje ve všech β -polohách pyrrolových jader navázané substituenty, jimiž jsou 4 methyly, 2 vinyly a 2 propionáty (vizte obrázek č. 1[B], strana č. 12) [1].

Porfyriny se chovají jako slabé dvojsytné kyseliny. Jsou schopné nahradit oba pyrrolové atomy vodíku za ionty kovu v alkalickém prostředí soli. Zbývající dva pyrrolové atomy dusíku obsahují volné elektronové páry. Porfyrinové soli těžkých kovů jsou navíc stabilizovány chelatačním vlivem těchto volných elektronových párů [2].



Obrázek č. 1: Schematické znázornění makrocyklu porfyrinu [A]. Struktura molekuly hemu [B]. Upraveno a převzato z [2].

1.1.1 Nejdůležitější hemoproteiny

Hem je poměrně složitě syntetizován v lidském organismu a následně je inkorporován do celé řady proteinů, za vzniku hemoproteinů. Následuje výčet těch nejdůležitějších skupin hemoproteinů:

Hem vázaný na protein globin dává vzniknout hemoglobinu. Hemoglobin má schopnost reverzibilně vázat kyslík a transportovat ho krevním řečištěm [1]. Vazba kyslíku na hemoglobin je zprostředkována přes iont $[\text{Fe}(\text{II})]$. Kyslík je schopen vázat se pouze na komplex obsahující dvoumocný iont železa $[\text{Fe}(\text{II})]$, nikoli na trojmocný iont železa $[\text{Fe}(\text{III})]$ [3]. Myoglobin je strukturně podobný hemoglobinu. Myoglobin se vyskytuje ve svalových buňkách obratlovců i bezobratlých [1].

Většina hemoproteinů účastnících se oxidoredukčních reakcí se řadí do skupiny cytochromů. Zde zastupují funkci přenašečů elektronů. Mezi významné zástupce patří cytochrom c [1].

Hemoproteiny mohou také plnit funkci enzymovou. Příkladem mohou být katalasy, jejichž úkolem je rozklad peroxidu vodíku [1]. Dalším hemoproteinovým enzymem je peroxidasa, která má za úkol aktivovat peroxid vodíku [4]. Hemoproteiny se též podílí na aktivaci kyslíku a typickým zástupcem této skupiny hemových enzymů jsou

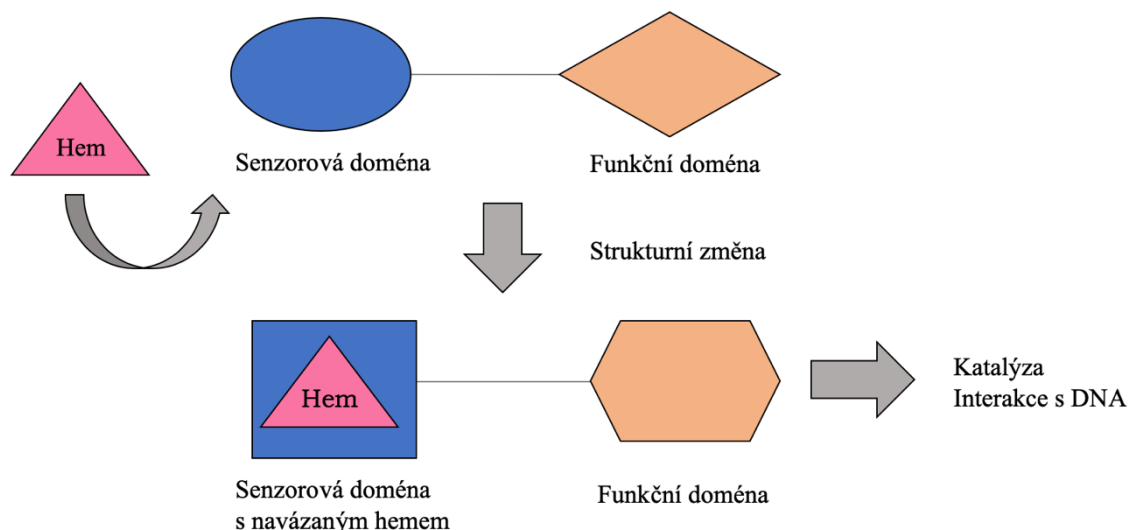
cytochromy P450, které pomáhají aktivovat molekulu kyslíku rozštěpením vazby O-O [3,4].

Ve všech výše zmíněných hemoproteinech tvoří hem katalytické nebo funkční centrum daných proteinů. Hem však může plnit i další funkce v jiné skupině hemoproteinů a to funkci signální molekuly. Jedná se o skupinu hemových sensorových proteinů [5].

1.2 Hemové sensorové proteiny

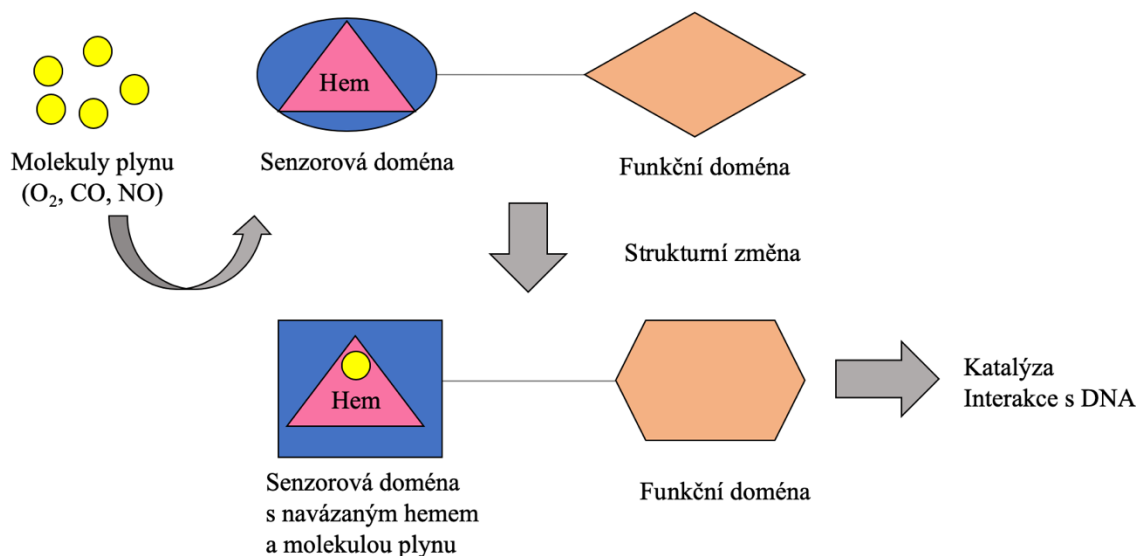
Hemové sensorové proteiny lze rozdělit na dvě skupiny, (i) hemové sensorové proteiny, které detekují hem a (ii) hemové sensorové proteiny, které detekují plyny.

Naprostá většina hemových sensorových proteinů se skládá ze dvou domén. První doménou je sensorová doména (většinou na N-konci proteinového řetězce) a druhou funkční doména (C-terminální). V případě skupiny hemových sensorových proteinů, které detekují hem, si mechanismus jejich působení lze představit následovně. Hem má schopnost navázat se na sensorovou doménu. Pokud se tak stane, tak dojde ke strukturní změně sensorové domény. Hem má zde funkci nositele prvního signálu. Tato strukturní změna vyvolá druhý signál, díky kterému dojde ke strukturní změně funkční domény. Mechanismus je znázorněn na obrázku č. 2, strana č. 14. Tyto strukturní změny mají za následek aktivaci nebo inaktivaci různých reakcí v závislosti na množství hemu v okolí [4]. Má to vliv na mnoho fyziologických funkcí, jako jsou protein-kinasová aktivita, degradace proteinů, regulace transkripce, regulace translace a funkce iontových kanálů [4,6].



Obrázek č. 2: Schéma mechanismu působení hemových sensorových proteinů, které detekují hem. Molekula hemu se váže na sensorovou doménu. Tím je vyvolána její strukturální změna a též strukturální změna funkční domény. Tyto strukturální změny mohou mít vliv na katalytickou aktivitu funkční domény nebo na její schopnost interakce s DNA. Upraveno a převzato z [7].

Druhou skupinu hemových sensorových proteinů zastupují hemové sensorové proteiny, které detekují plyny. V tomto případě sensorová doména již obsahuje navázanou molekulu hemu, která je schopná detekovat molekuly plynu. Velká pozornost je věnována hemovým sensorovým proteinům, které detekují molekuly O_2 , NO a CO . Molekula hemu je k proteinu sensorové domény obvykle vázána pomocí koordinačních vazeb. Navázání molekuly plynu na hem v sensorové doméně představuje první signál. Tento signál vede ke strukturální změně sensorové domény proteinu. Tato změna působí jako druhý signál a vyvolá strukturální změnu funkční domény. Mechanismus je vyobrazen na obrázku č. 3, strana č. 15. Ke strukturálním změnám a vyvoláním prvního signálu dochází v závislosti na množství plynu v okolí a jeho schopnosti navázat se hemové železo. Funkční doména má buď enzymovou aktivitu, konkrétně může mít kinasovou, fosfodiesterasovou a guanylátcyklasovou aktivitu, nebo vykazuje funkci transkripčního faktoru tj. má schopnost se vázat na DNA [4].



Obrázek č. 3: Schéma mechanismu působení hemových sensorových proteinů, které detekují plyny. Na sensorovou doménu s navázanou molekulou hemu se váže molekula plynu. Tím je vyvolána její strukturální změna a též strukturální změna funkční domény. Tyto strukturální změny mohou mít vliv na enzymovou aktivitu funkční domény nebo na její schopnost interakce s DNA. Upraveno a převzato z [7].

1.2.1 Hemové sensorové proteiny, které detekují hem

1.2.1.1 Charakteristické vlastnosti hemových sensorových proteinů, které detekují hem

1.2.1.1.1 Thiolát jako vazebné místo hemu

Jednou z charakteristických vlastností hemových sensorových proteinů, které detekují hem je, že v místech vazby hemu na sensorovou doménu se většinou nachází cysteinový zbytek. Molekula hemu s trojmocným iontem železa [Fe(III)] se váže na tento Cys zbytek pomocí thiolátové vazby. Thiolátová vazba je relativně slabá, a proto může dojít k disociaci vazby hemu z jeho vazebného místa na sensorové doméně [7]. Snadná disociace hemu má důležitý význam, jelikož může regulovat řadu fyziologických funkcí. Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.2, tak molekula hemu plní funkci prvního signálu. To je také jedním z důvodů, proč je žádoucí, aby vazba molekuly hemu na protein byla slabá [4].

1.2.1.1.2 Hem regulační motiv nebo CP motiv

Hem regulační motiv (HRM) je typická sekvence aminokyselinových zbytků vyskytující se v sensorové doméně hemových sensorových proteinů, které detekují hem. HRM bývá také někdy označován jako CP motiv. Označení pochází z počátečních písmen aminokyselinových zbytků vyskytujících se v sensorové doméně. Aminokyselinovými

zbytky bývá obvykle Cys (vizte kapitola 1.2.1.1.1.) a v jeho bezprostředním sousedství se vyskytuje Pro. HRM plní důležitou úlohu při detekci změn v koncentraci hemu [8].

Hemem regulovaný inhibitor (HRI) (podrobněji o tomto sensorovém proteinu vizte kapitola 1.2.1.2), patřící do skupiny hemových sensorových proteinů, které detekují hem, se vyznačuje tím, že v C-terminální doméně má dva CP motivy. Jeden z CP motivů obsahuje vazebné místo pro hem. Tímto CP motivem je Cys409 následovaný Pro410. Pokud je v aminokyselinové sekvenci hned za Cys409 vázán Pro410, tak je thiolátová vazba iontu železa hemu na tento Cys slabší, než kdyby vedle Cys409 nebyl prolin přítomen [9]. Druhý CP motiv v sekvenci HRI neinteraguje s iontem železa hemu, což ilustruje, že ne všechny CP motivy v hemových sensorových proteinech jsou využity jako vazebná místa pro hem. Některé hemové sensorové proteiny, které detekují hem, vůbec CP motiv nemají, v takových případech ke koordinaci iontu železa hemu dochází prostřednictvím thiolátové skupiny Cys [4].

1.2.1.1.3 Rychlost disociace hemu

Jak již bylo zmíněno dříve (v kapitole 1.2.1.1.1), tak interakce trojmocného iontu železa hemu s thiolátem [Fe(III)hem-thiolát] je relativně slabá. Srovnáním hemových sensorových proteinů, které detekují hem, s jinými skupinami hemoproteinů (př. hemoglobiny a myoglobiny) bylo zjištěno, že se jejich konstanty rychlosti disociace hemu mohou lišit. Konstanta rychlosti disociace hemu je vyšší u hemových sensorových proteinů, které detekují hem, na rozdíl od asociační rychlostní konstanty, která se u jednotlivých skupin hemoproteinů výrazně neliší. Disociace/asociace hemu je důležitá pro správné fungování fyziologických procesů, které jsou ovlivňovány hemovými sensorovými proteiny, které detekují hem. Těsná vazba hemu na protein by nebyla žádoucí [4].

1.2.1.1.4 Vazba hemu závislá na změně redoxního stavu železa

Jak již bylo detailně vysvětleno výše, v hemových sensorových proteinech, které detekují hem, je hem s trojmocným iontem železa [Fe(III)] slabě vázán na protein. Tato vazba je zprostředkována přes thiolátovou skupinu aminokyselinového zbytku Cys (vizte detailně kapitola 1.2.1.1.1). Může však dojít i ke změně oxidačního stavu iontu železa tj. iont železa hemu může být ze svého oxidovaného stavu [Fe(III)] redukován na [Fe(II)].

Pokud hemový komplex obsahuje redukovaný iont železa [Fe(II)], tak je jeho vazba na protein přes Cys zbytek ještě slabší než pokud hemový komplex obsahuje jeho

oxidovanou formu [Fe(III)]. Hem může být tedy snadněji disociován z hemového komplexu obsahující redukovanou formu iontu železa [Fe(II)] než z hemového komplexu obsahující jeho oxidovanou formu [Fe(III)]. Tato skutečnost je zapříčiněna aniontovým charakterem thiolátové skupiny Cys. Pokud je Cys zbytek nahrazen ligandem obsahující dusík, jako je např. His, je tento ligand (imidazolová skupina) schopen lépe vázat hem s iontem železa v redukovaném stavu [Fe(II)] [7].

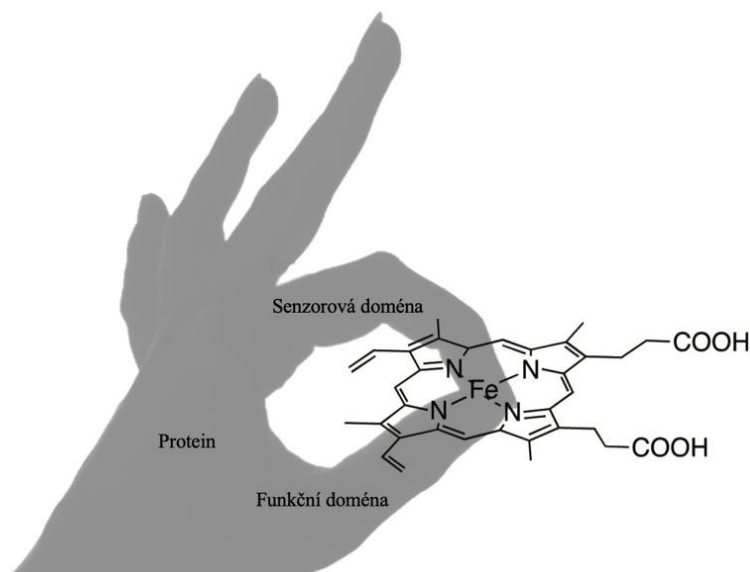
1.2.1.1.5 Proteinová flexibilita a plasticita

Hemové sensorové proteiny, které detekují hem, se od většiny ostatních hemoproteinů liší výraznou flexibilitou své proteinové struktury [7,9].

Již byl zmíněn (vizte kapitola 1.2.1.1.2) jeden z hlavních zástupců hemových sensorových proteinů, které detekují hem, tj. HRI (detailněji se tomuto proteinu věnuje kapitola 1.2.1.2). HRI, stejně jako ostatní hemové sensorové proteiny, které detekují hem, se skládá ze sensorové a funkční domény. Sensorová doména je umístěna v N-terminální části proteinu, kde se nachází klíčový His zbytek nezbytný pro koordinaci iontu železa hemu. His má zde funkci axiálního ligandu neboli sensorového místa pro hem. Funkční doména je na rozdíl od sensorové domény v C-terminální části proteinu. Ve funkční doméně se nachází druhý klíčový axiální ligand hemu tj. Cys zbytek. V přítomnosti hemu a jeho navázání na sensorovou doménu může dojít k intramolekulární interakci mezi oběma doménami a jejich strukturní změně [9,10].

Předpokládá se, že HRI je velmi flexibilní. Flexibilitu a schopnost HRI interagovat s hemem si lze představit pomocí modelu reprezentovaného lidskou ruku (ta znázorňuje celý protein). Její prsty, ukazováček a palec, představují již zmíněné dvě domény. Ukazováček symbolizuje sensorovou doménu a palec funkční doménu. Oba tyto prsty (tj. domény) propojuje molekula hemu, což má znázorňovat velkou flexibilitu celého proteinu, který za přítomnosti hemu „přiblíží“ obě domény do bezprostřední blízkosti tak, aby hem mohl být navázán na obě domény, nejen na sensorovou doménu [9,10]. Schéma je vyobrazeno na obrázku č. 4, strana č. 18.

Flexibilitu hemových sensorových proteinů, které detekují hem, lze ilustrovat experimentem, že pokud jeden z axiálních ligandů iontu železa hemu mutuje, může být tento původní ligand nahrazen ligandem jiným nacházejícím se v blízkosti původního ligandu [4].



Obrázek č. 4: Model znázorňující flexibilitu hemových sensorových proteinů pomocí představy lidské ruky. Ukazováček a palec symbolizují sensorovou a funkční doménu interagující s molekulou hemu. Upraveno a převzato z [4].

1.2.1.2 Hemem regulovaný inhibitor

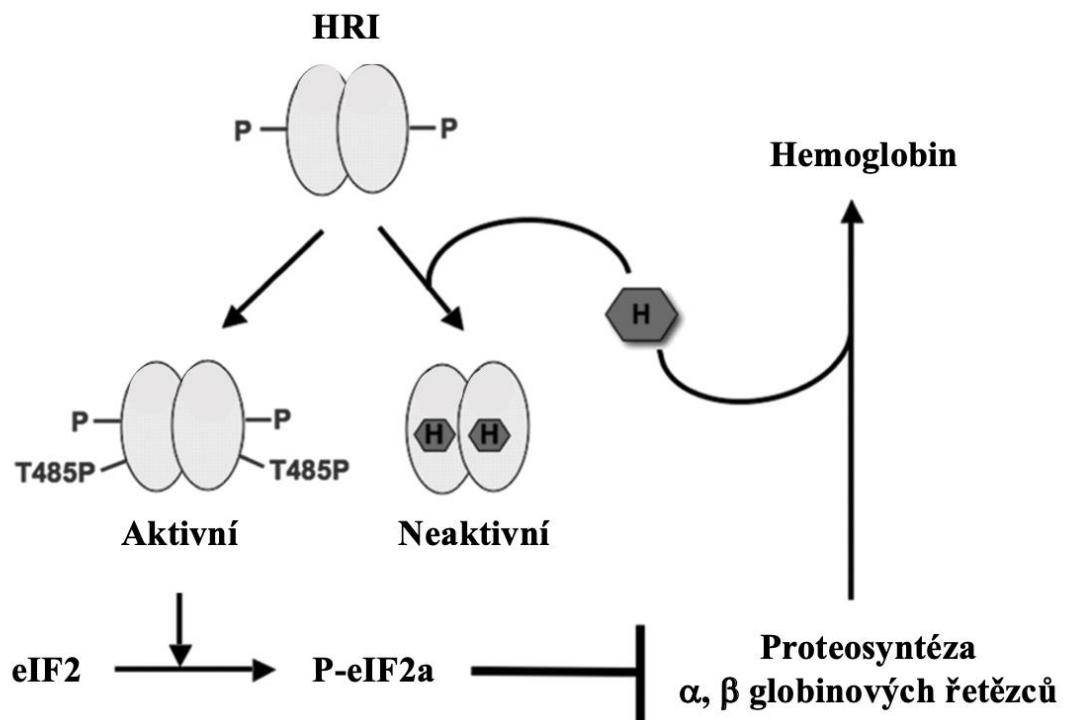
Jak již bylo řečeno v kapitole 1.2, hemové sensorové proteiny, které detekují hem, hrají důležitou roli při regulaci mnoha fyziologických funkcí. Mezi hemové sensorové proteiny, které detekují hem, se řadí např. HRI.

Zralé erythrocyty, které jsou zodpovědné za přenos kyslíku krevním řečištěm, obsahují vysokou koncentraci hemoglobinu. Pro syntézu hemoglobinu jsou důležité 3 složky v určitém poměru. Těmito složkami jsou α -globin, β -globin a hem. Pro tvorbu stabilního komplexu $\alpha_2\beta_2$ hemoglobinu se čtyřmi molekulami hemu je vhodný poměr složek 2:2:4. Pokud je jedna z těchto složek v nepoměru, může to vést až ke vzniku onemocnění, z důvodu cytotoxicity jednotlivých složek vůči zralým erythrocytům, jako např. thalassémie a hypochromní anémie při nedostatku železa [11].

Pro syntézu hemoglobinu a diferenciaci erytrocytů je velmi důležitý iont železa, který je nezbytný pro vznik hemu [12]. Mimo výše popsané strukturní role hemu v molekule hemoglobinu (vizte předchozí odstavec), má hem za úkol také regulovat transkripci genů globinů [12,13]. Hem zde působí jako signální molekula se schopností řídit translaci v prekurzorech erythrocytů. Hem se naváže na sensorovou i funkční doménu HRI, a tím je řízena translace globinů (vizte detailně další odstavec) [14].

Jestliže je eukaryotní buňka vystavena stresu, aktivuje některé obranné mechanismy. Tyto obranné mechanismy umožňují buňce se přizpůsobit extrémním

podmínkám a zajistit tak její přežití. Během buněčného stresu je snížen celkový metabolismus, např. dochází k inhibici translace mediátorové RNA (mRNA), za účelem ušetření energie k obnovení poškození způsobených stresem. Translace mRNA je inhibována již v její počáteční fázi, v její iniciaci, mimo jiné také prostřednictvím HRI. HRI bývá také označován jako hemem regulovaná kinasa eukaryotního iniciačního faktoru 2 α (eIF2 α). K aktivaci HRI dochází primárně při nedostatku hemu [15]. Při nízké koncentraci intracelulárního hemu, HRI fosforyluje α -podjednotku eIF2, což má za následek přerušení iniciace translace, a tedy zastavení translace. Za normálních podmínek je na globinový řetězec navázána jedna molekula hemu. Při dostatečně vysoké koncentraci hemu se hem váže na HRI, jeden axiální ligand (His) je v sensorové doméně a druhý (Cys) se nachází v doméně funkční (vizte obrázek č. 4, strana č. 18). Dochází k inaktivaci HRI a následné syntéze proteinů (globinů) a k optimálnější tvorbě hemoglobinu. Pokud je intracelulární koncentrace hemu nízká, disociuje tato molekula z HRI, tím se aktivuje funkční doména HRI s kinasovou aktivitou a dochází nejprve k autofosforylaci na Thr485 (T485P). Takto autofosforylovaný HRI následně fosforyluje α -podjednotku eIF2 (vzniká P-eIF2 α), a tím se inhibuje syntéza proteinů, resp. globinů. [16,17]. Mechanismus je znázorněn na obrázku č. 5, strana č. 19.



Obrázek č. 5: Detekce intracelulární koncentrace hemu prostřednictvím HRI a jeho role v regulaci syntézy globinů a hemoglobinu. Aktivace HRI pomocí autofosforylace T485P při nízké koncentraci intracelulárního hemu (vlevo). Následná fosforylace eIF2 a inhibice syntézy globinových řetězců. V druhém

případě, při vysoké koncentraci intracelulárního hemu dojde k inaktivaci HRI (vpravo) a poté syntéza globinů může probíhat a může se tvořit hemoglobin. Upraveno a převzato z [11]. eIF2: eukaryotní translační iniciační faktor 2, P-eIF2 α : fosforylovaná α podjednotka eukaryotního translačního iniciačního faktoru 2, H: hem, HRI: hemem regulovaný inhibitor.

1.2.2 Hemové sensorové proteiny, které detekují plyny

Druhou skupinou sensorů řadící se k hemovým sensorovým proteinům jsou hemové sensorové proteiny, které detekují plyny. Jak již bylo detailně popsáno v kapitole 1.2, hemové sensorové proteiny, které detekují plyny, obsahují sensorovou a funkční doménu. Na rozdíl od hemových sensorových proteinů, které detekují hem je v sensorové doméně hemových sensorových proteinů, které detekují plyny, hem navázán relativně pevně. Vazba hemu je na sensorovou doménu proteinu zprostředkována velmi často postranní skupinou aminokyseliny histidinu (nebo jinou aminokyselinou než je cystein) [5].

Dle typu plynné molekuly, která je rozeznána sensorovou doménou se hemové sensorové proteiny, které detekují plyny, dělí na (i) hemové sensorové proteiny, které detekují kyslík, (ii) hemové sensorové proteiny, které detekují oxid dusnatý nebo (iii) hemové sensorové proteiny, které detekují oxid uhelnatý [4]. V hemových sensorových proteinech, které detekují plyny, se vyskytuje několik specifických typů sensorových domén. Konkrétně: PAS doména (akronym z anglických názvů proteinů, ve kterých se tento motiv vyskytuje: „*Drosophila* period clock protein“, „vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ a „*Drosophila* single minded protein“), GAF doména (akronym „cyclic guanosine monophosphate-specific and -stimulated phosphodiesterase“, „adenylate cyclase“ a „*E. coli* formate hydrogen lyase transcription activator“), globinová doména, H-NOX doména (z anglického „heme-nitric oxide/oxygen binding domain/protein“) a CoxA doména (z anglického „CO-oxidation transcriptional Activator“) [5,18].

1.2.2.1 Hemové sensorové proteiny, které detekují kyslík

Jednou z nejdůležitějších plynných molekul pro metabolismus celé řady organismů, která funguje jako finální akceptor elektronů v mitochondriích, je molekula kyslíku. Navíc v případě organismů, které mohou přizpůsobit svůj metabolismus jak na anaerobní, tak na aerobní podmínky (tj. zejména u bakterií a archeí) má molekula kyslíku důležitou signální funkci. Sensorové domény hemových sensorových proteinů, které detekují kyslík, mohou obsahovat PAS doménu, GAF doménu nebo globinovou doménu [5].

1.2.2.1.1 PAS doména

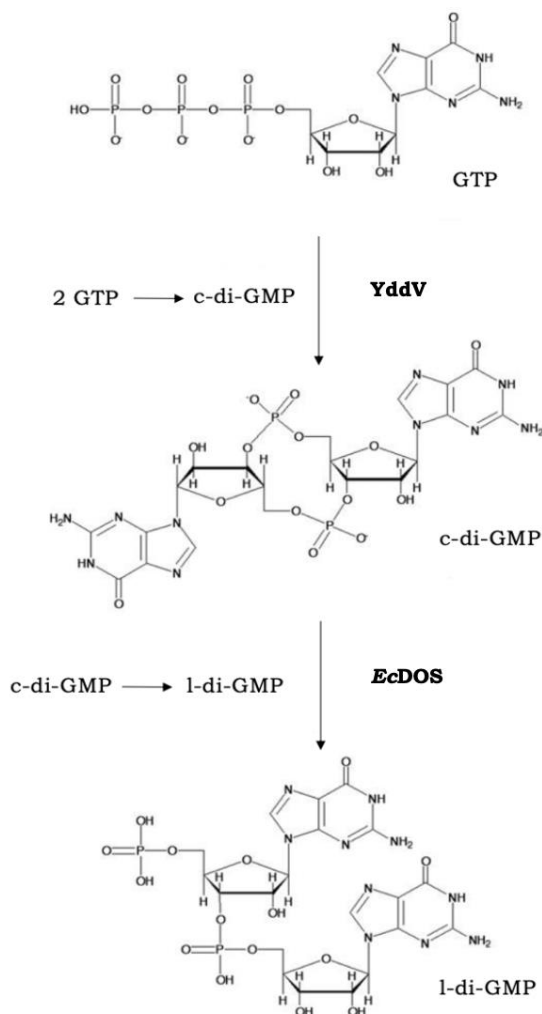
Pojmenování PAS domény je odvozeno od prvních tří proteinů (konkrétně zmíněných v kapitole 1.2.2), ve kterých byl tento strukturní motiv pozorován. Struktura PAS domény je poměrně dobře konverzovaná [19], skládá se z pětivláknových antiparalelních β -skládaných listů a čtyř α -helixů. PAS doména je schopná vázat různé ligandy. Pokud je tímto ligandem hem, může se na něj vázat molekula kyslíku, což je důležité pro intramolekulární transdukcí způsobenou tímto signálem [5,20].

Jako první hemový sensorový protein, který detekuje kyslík a zároveň obsahuje PAS doménu, byla objevena histidinkinasa v bakteriích *Rhizobium meliloti* nebo *Sinorhizobium meliloti* (FixL) [4]. FixL je součástí dvousložkového signálního systému a je schopen regulovat expresi genů zapojených do fixace dusíku v závislosti na koncentraci kyslíku. PAS doména FixL prostřednictvím iontu železa hemu detekuje kyslík a předává signál o jeho přítomnosti na funkční doménu, které má histidinkisanovou aktivitu [19,21].

1.2.2.1.1.1 Přímý kyslíkový sensor s fosfodiesterasovou aktivitou z *E. coli* (EcDOS)

Jedním ze zástupců hemových sensorových proteinů, které detekují O_2 a obsahují PAS doménu je přímý kyslíkový sensor z bakterie *Escherichia coli* (EcDOS), na který se zaměřuje tato práce. Název EcDOS pochází z anglického „*Escherichia coli* direct oxygen sensor“ [5]. Protein EcDOS je dimer, v jehož N-terminální části jsou umístěny dvě za sebou jdoucí sensorové PAS domény (PAS-A a PAS-B), avšak hem je navázaný pouze na jedné z nich, a to na PAS-A. Funkční doména, která obsahuje dvě části, označené dle jejich typického motivu jako tzv. EAL a GGDEF, je umístěna v C-terminální části proteinu. Funkční doména EcDOS vykazuje fosfodiesterasovou aktivitu, která se projevuje tak, že po navázání O_2 na hem sensorové domény dojde k přeměně cyklického bis-(3',5')-guanosinmonofosfátu (c-di-GMP) na linearizovanou formu cyklického bis-(3',5')-guanosinmonofosfátu (l-di-GMP) [22]. Pro bakterie je c-di-GMP důležitým druhým poslem regulující řadu fyziologických funkcí. Mezi tyto fyziologické funkce patří mezibuněčná komunikace, pohyb buněk, buněčná diferenciaci, virulence, tvorba biofilmů, rezistence na těžké kovy a další [23,24]. Pro přežití bakterie je důležité udržovat homeostázu c-di-GMP, která je regulována pomocí dvou enzymů. Těmito enzymy je výše zmiňovaný EcDOS, který katalyzuje linearizaci (degradaci) c-di-GMP pomocí fosfodiesterasy. Druhým enzymem je diguanylátcyklasa s globinovou strukturou

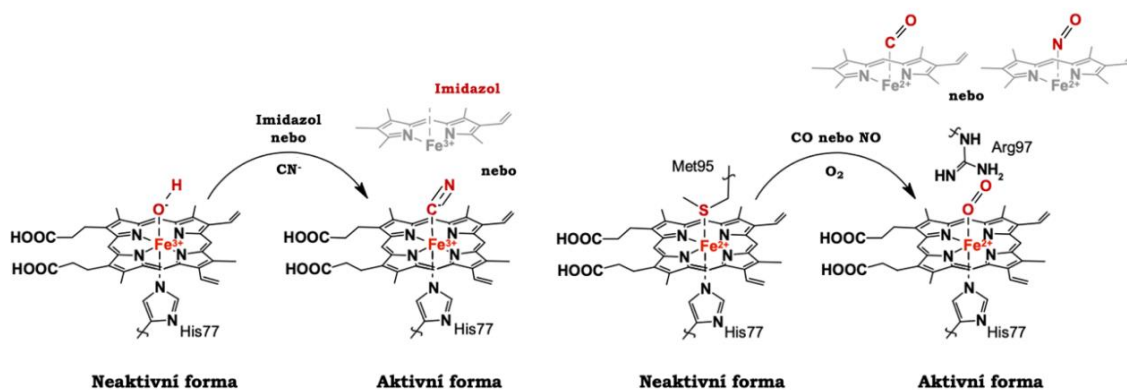
senzorové domény z bakterie *E. coli* (YddV). YddV obsahuje funkční doménu s diguanylátcyklasovou aktivitou, která katalyzuje syntézu c-di-GMP ze dvou guanosin-5'-trifosfátů (GTP) [22]. Výše zmíněné reakce katalyzované *EcDOS* a YddV jsou znázorněny na obrázku č. 6, strana č. 22.



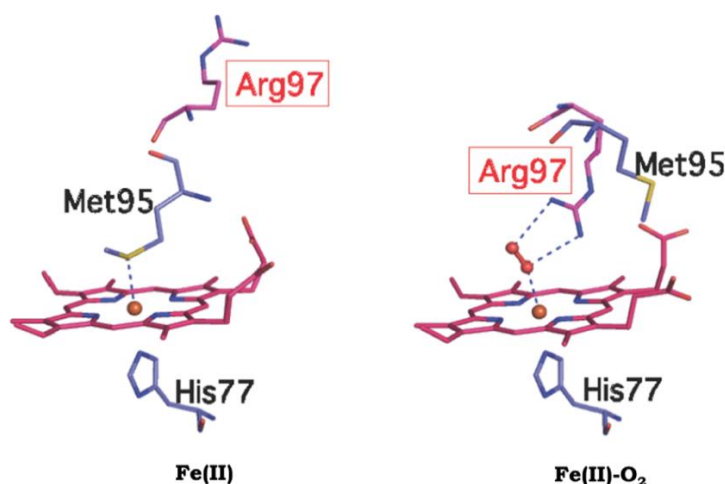
Obrázek č. 6: Reakce katalyzované diguanylátcyklasovou aktivitou YddV a fosfodiesterasou aktivitou *EcDOS*. YddV s diguanylátcyklasovou aktivitou katalyzuje reakci 2 GTP za vzniku c-di-GMP. Následně *EcDOS* s fosfodiesterasovou aktivitou katalyzuje přeměnu c-di-GMP na l-di-GMP. Upraveno a převzato z [25]. GTP: guanosin-5'-trifosfát, c-di-GMP: cyklický bis-(3',5')-guanosinmonofosfát, l-di-GMP: linearizovaná forma cyklického bis-(3',5')-guanosinmonofosfátu.

Iont železa hemu je do PAS-A domény proteinu *EcDOS* vázán pomocí axiálního ligandu aminokyselinového zbytku His77. Pokud je na hemu s trojmocným iontem železa [Fe(III)] navázán druhý axiální ligand, hydroxidový aniont, je tato forma proteinu *EcDOS* katalyticky neaktivní. Je-li však šestým ligandem iontu železa hemu kyanidový aniont nebo imidazol, stává se protein katalyticky aktivní. Pokud je změněn oxidační stav iontu železa, tj. iont železa hemu je ze svého oxidovaného stavu [Fe(III)] redukován na [Fe(II)],

je jako šestý ligand koordinačně vázán aminokyselinový zbytek Met95. Tato forma *EcDOS* nevykazuje fosfodiesterasovou aktivitu. K aktivaci dochází, pokud se v okolí *EcDOS* nachází O_2 , NO nebo CO (vizte obrázek č. 7, strana č. 23) [5,26]. Nejprve dojde k disociaci Met95 z hemu a následně ke změně pozice Arg97 tak, že tento distální ligand stabilizuje interakci molekuly O_2 s hemem (vizte obrázek č. 8, strana č. 23) [27]. *EcDOS* je také schopen interagovat s H_2S , což je další důležitá signální plynná molekula, která stimuluje fosfodiesterasovou aktivitu. V aerobním prostředí *EcDOS* s hemem obsahující trojmocný iont železa [Fe(III)] reaguje s H_2S za vzniku meziprojektu [Fe(III)]-SH. Poté dochází k redukci iontu železa na [Fe(II)] a následně k rychlému navázání O_2 . Poté je hem s navázaným O_2 autooxidován na hem s trojmocným iontem železa [Fe(III)] [26].



Obrázek č. 7: Vztah koordinační struktury iontu železa hemu v PAS-A doméně a enzymové aktivity *EcDOS*. Aktivace *EcDOS* tím, že oxidovaná forma iontu železa [Fe(III)] hemu interaguje s CN^- nebo imidazolu (vlevo). Interakce molekul O_2 , NO nebo CO s redukovanou formou iontu železa [Fe(II)] v PAS-A doméně rovněž způsobí aktivaci enzymové aktivity *EcDOS* (vpravo). Upraveno a převzato z [26].



Obrázek č. 8: Změna koordinační struktury redukováného iontu železa hemu [Fe(II)] v PAS-A doméně *EcDOS* v absenci a v přítomnosti molekuly O_2 . Na dvoumocný iont železa [Fe(II)] hemu je navázán Met95 (vlevo), který je v přítomnosti O_2 z hemu disociován a následně je změněna pozice Arg97 (vpravo). Arg97 stabilizuje interakci mezi hemem a O_2 . Upraveno a převzato z [28].

Pro většinu enzymových reakcí, které využívají nukleotidy jako např. fosfodiesterasy, kinasy, fosfatasy, guanylátcyklasy apod., je nezbytný iont Mg^{2+} . V některých těchto případech může být funkce iontu Mg^{2+} nahrazena iontem Mn^{2+} [29]. Porovnáním fosfodiesterasové aktivity *EcDOS* v přítomnosti Mg^{2+} a Mn^{2+} bylo dokonce zjištěno, že pokud *EcDOS* obsahuje oxidovanou formu iontu železa hemu [Fe(III)] bez externích ligandů (kyanidový aniont, imidazol) v přítomnosti Mn^{2+} , je enzymová aktivita *EcDOS* výrazně rychlejší než pokud je přítomen Mg^{2+} . V přítomnosti Mn^{2+} dochází k dvoustupňové hydrolýze c-di-GMP přes meziprodukt l-di-GMP až na GMP. V přítomnosti Mg^{2+} je hydrolýza c-di-GMP na l-di-GMP pomalejší a k druhému stupni přeměny na GMP vůbec nedochází [28]. Uvažuje se, že se Mn^{2+} může vyskytovat v aktivním místě *EcDOS* nebo může být v poloze aktivního místa koordinován. Pro *EcDOS* obsahující redukovaný stav iontu železa hemu tj. [Fe(II)] v přítomnosti Mg^{2+} je pro stimulaci fosfodiesterasové aktivity nutná koordinace externích ligandů (O_2 , NO nebo CO) na iont železa hemu. Bylo prokázáno, že pokud je na *EcDOS* navázán O_2 , NO nebo CO, tak tato vazba zvyšuje afinitu Mg^{2+} k aktivnímu místu a/nebo k vytvoření koordinační struktury Mg^{2+} [5].

1.2.2.1.2 GAF doména

Název GAF domény vychází z anglického pojmenování tří proteinů, které obsahují tuto doménu (detailně vizte kapitola 1.2.2). GAF doména má podobnou strukturu jako PAS doména, liší se pouze svojí aminokyselinovou sekvencí. Strukturální podobnost GAF a PAS domény naznačuje jistou příbuznost těchto dvou domén. Ačkoli jsou GAF doména a PAS doména strukturálně podobné, liší se ve svém vazebném místě hemu. GAF doména plní několik funkcí, mezi které patří např. vazba malých molekul (např. flavin, adenin, cyklický guanosin-3',5'-monofosfát (cGMP) nebo hem) [30].

Mezi jedny z důležitých proteinů obsahující GAF doménu patří proteiny detekující kyslík s histidinkinasovou aktivitou z bakterie *Mycobacterium tuberculosis*, které jsou známy pod označením DosS a DosT. Proteiny DosS a DosT jsou součástí dvousložkového signálního transdukčního systému. Pokud je bakteriální buňka vystavena hypoxickým podmínkám, jsou tyto histidinkinasy schopné spolu s regulátorem odezvy regulovat expresi genů nezbytných pro přežití buňky [18,31]. Z nových studií je známo, že DosS a DosT jsou významným místem terapeutického zásahu při léčbě tuberkulózy, která je způsobena již výše zmíněnou bakterií *Mycobacterium tuberculosis*.

Bylo zjištěno, že inhibice DosS a DosT je schopna potlačit perzistenci *Mycobacterium tuberculosis* a tento terapeutický zásah může zkrátit dobu léčby tuberkulózy [32].

1.2.2.1.3 Globinová doména

Hemoglobin a myoglobin jsou typickými zástupci hemoproteinů s globinovou strukturou. Podobné strukturní uspořádání lze také pozorovat u některých hemových sensorových proteinů archeí a bakterií, které detekují kyslík. Globinová doména je složena z osmi α -helixů, které se označují písmeny A až H analogicky jako v případě hemoglobinu a myoglobinu [33]. Na rozdíl od hemoglobinu a myoglobinu se v globinové doméně sensorových proteinů nevyskytuje D-helix a E-helix, ačkoli mají společný genetický původ [34]. Globinová doména se svojí strukturou liší od PAS a GAF domény, stejně jako schopností vázat další ligandy. Globinová doména váže jako prostetickou skupinu (ligand) pouze hem na rozdíl od PAS a GAF domény [33].

Mezi významné zástupce hemových sensorových proteinů, které detekují kyslík, s globinovou strukturou sensorové domény patří YddV. Hemoprotein YddV se spolu s EcDOS podílí na regulaci c-di-GMP v bakteriích (vizte kapitola 1.2.2.1.1.1, obrázek č. 6, strana č. 22). Výše zmíněné c-di-GMP hraje zásadní roli při regulaci syntézy polysacharidů a biofilmu. Do stádia biofilmu přechází některé bakterie, pokud jsou vystaveny nepříznivým podmínkám, aby si zajistily přežití [35].

1.2.2.2 Hemové sensorové proteiny, které detekují oxid dusnatý

Další důležitou skupinou hemových sensorových proteinů, které detekují plyny, jsou ty, které detekují oxid dusnatý. U savců je z L-argininu syntetizován citrulin a již zmiňovaný oxid dusnatý pomocí enzymu NO synthasy [36]. Oxid dusnatý patří mezi významné regulační molekuly, podílející se v savčím organismu na několika fyziologických a patologických funkcích (např. funkce regulace imunitního, cévního a nervového systému) [37,38]. K hlavním funkcím oxidu dusnatého na molekulární úrovni patří aktivace rozpustné guanylátcyklasy (sGC), která katalyzuje přeměnu GTP za vzniku cGMP. V lidském organismu je cGMP schopný regulovat biochemické pochody vaskulárního systému a umožňovat vazodilataci hladkého svalstva [39,40].

Jak již bylo uvedeno výše, sGC je důležitý zástupce hemových sensorových proteinů, které detekují oxid dusnatý. Protein sGC je heterodimer skládající se ze dvou typů podjednotek, z nichž pouze v jedné podjednotce je navázán kofaktor tj. hem [41]. Protein sGC obsahuje také specifickou H-NOX doménu, na které je navázán hem

s dvoumocným iontem železa [Fe(II)]. H-NOX doména je schopná detekovat koncentraci oxidu dusnatého a prostřednictvím přenosu tohoto signálu v přítomnosti NO do funkční domény následně dochází k zvýšení guanylátcyklasové aktivity [42].

1.2.2.3 Hemové senzorní proteiny, které detekují oxid uhelnatý

Několika přírodními a průmyslovými procesy vzniká v atmosféře CO. Těmito procesy může být např. vulkanická činnost nebo nedokonalé spalování organické hmoty (biotické i abiotické) [43,44]. Atmosférický CO je pro lidský organismus toxický, avšak pro aerobní i anaerobní bakterie a archea může být CO využíván jako zdroj energie [43–45]. Pro bakterie a archea, které využívají CO, může být oxid uhelnatý také důležitou signální molekulou detekovanou prostřednictvím hemových senzorních proteinů [43,44]. Mezi zástupce těchto senzorních proteinů patří transkripční faktor, CoxA fotosyntetické bakterie *Rhodospirillum rubrum* [45]. Jednou z funkcí CoxA je řízení anaerobního metabolismu CO. Stimulace transkripce CoxA je vyvolána vazbou CO na CoxA doménu obsahující hem s dvoumocným iontem železa [Fe(II)] [45,46].

2 Cíle bakalářské práce

Pro předkládanou bakalářskou práci byly stanoveny následující cíle:

1. Jedním z cílů této práce bylo připravit souhrn aktuálních publikovaných poznatků o hemových senzorných proteinech, které detekují plyny, se zaměřením na protein *EcDOS*.
2. Dalším cílem byla transformace buněk *E. coli* BL-21 (DE3) prostřednictvím plasmidu pET-28a(+)/*EcDOS* a exprese proteinu *EcDOS*.
3. Následujícím cílem bylo izolovat z buněk *E. coli* BL-21 (DE3) protein *EcDOS* a uskutečnit jeho purifikaci.
4. V neposlední řadě patří mezi cíle této bakalářské práce také pilotní charakterizace získaného preparátu proteinu *EcDOS*.
5. Pokud se prokáže, že získaný preparát proteinu *EcDOS* je enzymově aktivní, bude jako poslední cíl předkládané bakalářské práce pilotně testován vliv potenciálních inhibitorů hemových senzorných proteinů (konkrétně Artesunate a MSU-39446 (HC106)).

3 Materiál a metody

3.1 Použité přístroje

Analytické váhy:	HM-200, A&D Instruments LTD, UK
Autokláv:	Microjet, Enbio Technology Panasonic MLS-37812, Švýcarsko
Bezdotykový kahan:	Gasprofi2 SCS, WLD-TEC, Německo
Centrifugy:	Janetzki K 70D, MLW, výkyvný rotor, Německo Minicentrifuga myFuge Mini, Benchmark Scientific, USA Z 383 K, HERMLE, výkyvný rotor (max. 5 000 RPM), Německo
Centrifugační filtr:	Amicon Ultra, 30K, Millipore, Německo
Elektroforetická aparatura:	Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems, BIO RAD, USA
Inkubátory:	Mini Heating Dry Bath Incubator, MD-MINI, Major Science, USA Raven 2 Incubator, LTE Scientific Ltd, UK
Kolona pro gelovou chromatografii:	Superdex 200 10/300 GL, GE Healthcare, USA
Kolona pro HPLC:	Luna® 5 µm C18 (2) 100 Å, LC Column, 150 × 4,6 mm, Ea, USA
Laminární box:	BO 126, Labox, ČR
Magnetická míchačka:	ESP, Velp Scientifica Srl, Itálie MS 4, IKA C-MAG, Německo MS 7, IKA C-MAG, Německo
Laboratorní třepačky:	Multitron Pro, INFORS HT, Švýcarsko Scientific Incu-Shaker Shaking Incubator ES-60, MIULab, Čína Wisd WiseShake SHO, Witeg, Německo

pH metr:	pHenomenal, pH 1100L, VWR, ČR
Předvážky:	MXX-601, Denver Instrument, Německo 440-3SN, KERN, Německo
Přístroj pro gelovou chromatografii:	ÄKTAprime plus – GE Healthcare, USA
Přístroj pro HPLC:	1200 Series, Agilent Technologies, USA
Rotační třepačka:	Chemos Group, Cz, Německo
Scanner:	Epson Perfection V550 Photo, digital ICE technology, Japonsko
Spektrofotometr:	DS-11 Spectrophotometer, DeNovix, USA
Ultracentrifuga:	Ultracentrifuga Optima™ LE-80K, Beckman Coulter, osazená úhlovým rotorem type 70 Ti, 70 000 RPM, USA
Ultrazvukový homogenizátor:	Sonopuls HD 3100, sonda KE 76, Bandelin, Německo
Vortex:	Genius 3, IKA VORTEX, Německo
Zdroj pro elektroforézu:	EPS 301, Electrophoresis Power Supply, Amersham Pharmacia Biotech, USA

3.2 Použité chemikálie

BIOLOG Life Science, Germany	c-di-GMP
Bio Rad, USA:	Precision Plus Protein™ Standards
Erba Lachema, ČR:	bromfenolová modř chlorid sodný
Expedeon, Německo:	InstantBlue™ Protein Stain
Fluka, Švýcarsko:	akrylamid dodecylsírán sodný (SDS) lysosym N, N-methylen-bis-akrylamid tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) 2-merkптоethanol

GE Healthcare, USA:	TALON® Superflow™
LACHEMA BRNO, ČR:	ethanol ethylendiamintetraoctová kyselina peroxodisíran amonný
Lach-Ner, ČR:	dihydrogenfosforečnan draselný glycerol hydrogenfosforečnan didraselný
Linde, ČR:	dusík (g)
OXOID LDT, Anglie:	Bacto Tryptone Bacto Yeast Extract
Penta, ČR:	dithioničitan sodný glukosa glycin chlorid hořečnatý
Roth Chemicals, Německo:	imidazol
SIGMA, USA	dimethylsulfoxid (DMSO) hemin chlorid vápenatý isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG) kanamycin Luria Agar Luria Broth (LB) tetrabutyl amonium hydrogen sulfát
SERVA Elektrophoresis, Německo:	fenylmethylsulfonyl fluorid N, N, N', N'-tetramethylethylendiimin

Plasmid pET-28a(+)/*Ec*DOS byl poskytnut spolupracující laboratoří profesora Toru Shimizu, Ph.D., Tohoku Universita, Sendai, Japonsko.

Inhibitory *Artenusate* a MSU-39446 (HC106) byly poskytnuty profesorem Robem Abramovitchem, Department of Microbiology and Molecular Genetics, Michigan State University.

3.3 Použité metody

3.3.1 Příprava roztoků a médií

Příprava roztoku kanamycinu

Navážka 120 mg kanamycinu byla rozpuštěna ve 2 ml deonizované vody. Výsledný roztok (výsledná koncentrace 60 mg/ml) byl sterilizován filtrací pomocí 3 ml injekční stříkačky s 0,22 µm filtrem.

Příprava LB agaru

Navážka 8,0 g Luria Agarů byla rozpuštěna ve 200 ml deonizované vody. Toto množství bylo převedeno do zásobní lahve a následně sterilizováno vodní parou (autokláv Microjet, Enbio Technology) při teplotě 120 °C po dobu 20 minut.

Příprava LB média

Navážka 2,5 g Luria Broth byla rozpuštěna ve 100 ml deonizované vody. Toto množství bylo převedeno do zásobní lahve a následně sterilizováno vodní parou (autokláv Panasonic MLS-37812) při teplotě 120 °C po dobu 20 minut.

Příprava TB média

Navážka 12,0 g Bacto Yeast Extractu a 24,0 g Bacto Tryptone byla rozpuštěna v 900 ml deonizované vody. Tento objem byl rozdělen do 2 Erlenmayerových baněk po 450 ml. Erlenmayerovy baňky byly uzavřeny hliníkovou fólií a následně sterilizovány vodní parou (autokláv Panasonic MLS-37812) při teplotě 120 °C po dobu 20 minut. Navážka 2,3 g KH₂PO₄ a 12,5 g K₂HPO₄ byla rozpuštěna v 70 ml deonizované vody. Tento roztok byl filtrován přes filtrační papír do kádinky. Následně bylo do filtrátu přidáno 8,0 ml 50% (v/v) glycerolu. Celý roztok byl přemístěn do zásobní lahve a sterilizován (autokláv Panasonic MLS-37812) 20 minut vodní parou při teplotě 120 °C. Po sterilizaci bylo do každé Erlenmayerovy baňky sterilně přidáno 50 ml roztoku fosfátů a glycerolu.

Příprava agarových ploten s antibiotikem

LB agar byl rozpuštěn v mikrovlnné troubě na optimální teplotu. Poté v laminárním boxu (BO 126, Labox) bylo odebráno 20 ml LB agarů do sterilní zkumavky Falcon a bylo do něj přidáno 20 µl kanamycinu o koncentraci 60 mg/ml, aby výsledná koncentrace kanamycinu v LB agarů byla 60 µg/ml. Výsledný roztok byl opatrně promíchán a přemístěn do dvou sterilních Petriho misek po 10 ml. Petriho misky s roztokem LB

agaru a kanamycinu byly ponechány při laboratorní teplotě na vodorovném povrchu do ukončení procesu tvorby gelu.

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

Buňky *E. coli* BL-21 (DE3) byly vyjmuty z mrazáku a ponechány v nádobě s ledem a vodou po dobu cca 30 minut. V laminárním boxu (BO 126, Labox) byly připraveny dvě sterilní mikrozkušavky Eppendorf. Do každé bylo pipetováno 25 μ l buněk *E. coli* BL-21 (DE3). Pouze do jedné mikrozkušavky bylo přidáno 5 μ l plasmidu pET-28a(+)/*EcDOS* (160 ng/ μ l). Do druhé mikrozkušavky, která sloužila jako negativní kontrola, plasmid přidán nebyl. Následně byly obě mikrozkušavky ponechány na ledu. Poté bylo do obou mikrozkušavek sterilně přidáno 60 μ l LB média a jejich obsah byl promíchán. Poté byl obsah mikrozkušavek jednotlivě pipetován na agarové plotny s kanamycinem. Suspenze byla rovnoměrně rozprostřena po agarových plotnách a po vsáknutí suspenze do gelu, byly plotny přiklopeny víkem a uzavřeny pomocí parafilmu. Plotny k inkubaci byly umístěny do inkubátoru (Raven 2 Incubator, LTE Scientific) o teplotě 37 °C dnem vzhůru přes noc po dobu 17 hodin. Poté byly umístěny do lednice a skladovány k dalšímu zpracování.

3.3.3 Expresa proteinu *EcDOS*

V laminárním boxu (BO 126, Labox) bylo do sterilní zkumavky Falcon přeneseno 10 ml LB média a 10 μ l kanamycinu (výsledná koncentrace 60 μ g/ml), obsah zkumavky byl promíchán. Poté byla polovina roztoku (cca 5 ml) přenesena do druhé sterilní zkumavky Falcon. Vybrané a označené kolonie transformovaných buněk *E. coli* (příprava vizte kapitola 3.3.2) byly přeneseny do zkumavek Falcon s LB médiem a kanamycinem. Přenos byl uskutečněn plamenem sterilizovanou pinzetou a dřevěnými párátky. Zkumavky Falcon se svým obsahem byly umístěny do laboratorní třepačky (Scientific Incu-Shaker Shaking Incubator ES-60, MIULab) k inkubaci na 17 hodin při teplotě 37 °C, 200 otáček za minutu (RPM, z anglického revolutions per minutes). Po uplynutí této doby byla dřevěná párátko vyjmuta ze zkumavek Falcon sterilní pinzetou. Roztok byl dále použit k inokulaci TB média (vizte další odstavec).

Do dvou Erlenmayerových baněk obsahující TB médium bylo přidáno 500 μ l kanamycinu (výsledná koncentrace 60 μ g/ml) a 500 μ l suspenze obsahující transformované buňky *E. coli* BL-21(DE3). Následně došlo k inkubaci v laboratorní třepačce (Multitron Pro, INFORS HT) při teplotě 37 °C, 170 RPM po dobu 3,5 hodin.

Poté byla změřena optická denzita při 600 nm (OD_{600}) buněk *E. coli* v médiu na spektrofotometru (DS-11 Spectrophotometer, DeNovix). Hodnota tohoto parametru byla rovna 0,7. Poté byly upraveny podmínky inkubace na teplotu 15 °C, 140 RPM, po dobu 60 minut. Poté bylo odebráno 100 μ l kultivovaných buněk *E. coli* před indukcí isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG), aby mohla být provedena kontrola exprese proteinu *EcDOS* pomocí polyakrylamidové elektroforézy v prostředí dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) (vizte kapitola 3.3.6).

Expresí genu pro *EcDOS* byla indukována přidáním 100 μ l 0,5 M IPTG (výsledná koncentrace 0,1 mM) do Erlenmayerových buněk s TB médiem a buňkami. Erlenmayerovy baňky s obsahem byly umístěny do laboratorní třepačky (Multitron Pro, INFORS HT) přes noc na 20 hodin, při teplotě 15 °C, 140 RPM. Další den bylo odebráno 100 μ l buněk *E. coli* po indukcí IPTG, aby mohlo dojít ke kontrole exprese proteinu *EcDOS* pomocí SDS-PAGE (vizte kapitola 3.3.6). Expresí genu kódujícího protein *EcDOS* byla ukončena centrifugací buněk *E. coli* (Janetzki K 70D, MLW) při teplotě 4 °C, 3 000 RPM, po dobu 45 minut. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn. Peleta, kterou tvořily buňky *E. coli*, byla převedena do zkumavky Falcon a byla stanovena její hmotnost. Následně byly zkumavky Falcon s buňkami *E. coli* umístěny do mrazáku při teplotě -80 °C a uchovány pro další použití.

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

Buňky *E. coli*, které obsahovaly exprimovaný protein *EcDOS* (vizte kapitola 3.3.3), byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu cca 30 minut. Do zkumavek Falcon s těmito buňkami bylo přidáno 50 ml resuspendačního pufru (50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM ethylendiamintetraoctová kyselina, 1 mM fenylmethylsulfonyl fluorid, 0,2 mg/ml lysozym). Buňky *E. coli* byly resuspendovány pomocí resuspendačního pufru opatrným otáčením a promícháním zkumavky Falcon. Následně byl obsah zkumavky převeden do kádinky s magnetickým míchadlem. Kádinka s magnetickým míchadlem byla umístěna do nádoby s ledem a vodou, celé to pak bylo umístěno na magnetickou míchačku (ESP, Velf Scientifica). Následovala ultrazvuková sonikace suspenze za účelem narušení membrány buněk pomocí ultrazvukové sondy (Sonopuls HD 3100, sonda KE 76, Bandelin). Sonikace byla provedena za současného krouživého pohybu nádoby s ledem, do které byla vložena kádinka se suspenzí a ponořena ultrazvuková sonda. Sonikace se uskutečnila při amplitudě 55 % v 6 cyklech po 1 minutě. Mezi jednotlivými úseky

sonikace byla vždy minutová přestávka, aby se suspenze příliš nezahřívala. Po ukončení sonikace byla provedena inkubace buněk *E. coli* s roztokem heminu v dimethylsulfoxidu (DMSO) po dobu 20 minut. Do suspenze bylo pipetováno 1,5 ml roztoku heminu v DMSO s výslednou koncentrací 300 μM a ponecháno míchat na magnetické míchače (MS 4, IKA C-MAG) 20 minut při 4 °C. Poté byla suspenze převedena do centrifugačních kyvet. Následně byla provedena ultracentrifugace (Ultracentrifuga Optima™ LE-80K, Beckman Coulter, osazená úhlovým rotorem 70 Ti,) při teplotě 4 °C, 55 000 RPM, po dobu 1 hodiny. Po centrifugaci byl odebrán supernatant pro pozdější analýzu pomocí SDS-PAGE (vizte kapitola 3.3.6).

Během centrifugace byl připraven nosič pro afinitní chromatografii, TALON. Zásobní lahev se suspenzí TALONU byla promíchána, aby se suspenze homogenizovala a následně byly odebrány 3 ml této směsi. Poté následovala centrifugace TALONU (Z 383 K, HERMLE) po dobu 2 minuty při teplotě 4 °C a 200 RPM. Roztok nad usazeným TALONEM byl odstraněn, a bylo přidáno 5 ml pufru A (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl) za účelem ekvibrace TALONU. Po přidání pufru A byl roztok promíchán, centrifugován po dobu 2 minut při teplotě 4 °C a 200 RPM (Z 383 K, HERMLE) a roztok nad TALONEM opět odstraněn. Tento krok byl proveden celkem třikrát. Finálně bylo 1,5 ml takto ekvilibrovaného TALONU převedeno do těsně uzavíratelné plastové nádoby obsahující supernatant po ultracentrifugaci (vizte odstavec výše). Za stálého míchání na rotační třepače (Chemos Group, Cz) byl supernatant obsahující protein *EcDOS* inkubován s TALONEM 1 hodinu při teplotě 4 °C. Byla připravena prázdná chromatografická kolona s fritou, která byla upevněna do stojanu a promyta deionizovanou vodou. Po ukončení inkubace byla výše popsaná směs aplikována na fritu chromatografické kolony a byl jímán vzorek frakce obsahující látky, které s afinitním nosičem neinteragovaly. Následovalo promytí afinitního nosiče TALONU 50 ml pufru A. Poté byl protein *EcDOS* eluován 15 ml elučního pufru (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 200 mM imidazol) a odebrán do zkumavky Falcon. Z této zkumavky byl také odebrán vzorek pro analýzu pomocí SDS-PAGE (vizte kapitola 3.3.6).

Poté byla koncentrace proteinu *EcDOS* upravena pomocí kyvety Amicon. Kyveta Amicon obsahuje membránu s definovanou pórozitou, v našem případě je mezní hodnota molekulové hmotnosti proteinů, které přes póry v membráně již neprojdou, určena na 30 kDa. Kyveta Amicon s eluátem po afinitní chromatografii (vizte odstavec výše) byla

centrifugována (Z 383 K, HERMLE) 15 minut, 4 000 RPM, při teplotě 4 °C. Roztok s proteinem *EcDOS* byl vždy po 2 minutách promíchán pomocí pipety. Úprava koncentrace proteinu *EcDOS* pomocí kyvety Amicon byla prováděna do objemu 500 µl. Výsledný roztok proteinu *EcDOS* byl promíchán pomocí pipety a převeden do zkumavky Eppendorf.

Následovala gelová chromatografie uskutečněná na koloně Superdex 200 10/300 GL, GE Healthcare pomocí chromatografického systému (ÄKTAprime plus – GE Healthcare) se spektrofotometrickou detekcí při vlnové délce 280 nm. Kolona byla ekvilibrována 30 ml mobilní fází (20 mM Tris, 150 mM NaCl) a dávkovací ventil promyt mobilní fází. Preparát proteinu *EcDOS* byl před nanesením na kolonu filtrován přes 0,22 µm filtr. Pomocí dávkovače bylo dávkováno 500 µl preparátu proteinu *EcDOS* do chromatografické aparatury. Separace pomocí chromatografické aparatury byla vykonána při průtoku 0,8 ml/min mobilní fáze a tlaku 1 MPa. Frakce obsahující protein *EcDOS* po gelové chromatografii byly spojeny a převedeny do zkumavky Amicon s membránou. Poté došlo k centrifugaci spojených frakcí (Z 383 K, HERMLE) při teplotě 4 °C, 4 000 RPM na objem přibližně 250 µl. Frakce byly promíchány každé 2 minuty pomocí pipety. Poté byl odebrán vzorek finálního preparátu *EcDOS* pro analýzu pomocí SDS-PAGE (vizte kapitola 3.3.6). Nakonec byl protein *EcDOS* rozdělen do alikvotů po 40 µl, zmražen pomocí kapalného dusíku a umístěn do mrazáku o teplotě –80 °C a skladován pro další využití.

3.3.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinu *EcDOS*

Pro stanovení koncentrace proteinu *EcDOS* byla využita metoda „Protein A280“ v mikroobjemu pomocí přístroje DS-11 Spectrophotometer, DeNovix. Koncentrace proteinu *EcDOS* byla určena na základě měření absorbance při vlnové délce 280 nm dle Lambert-Beerova zákona (1):

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot l} \quad (1)$$

v němž c je koncentrace proteinu v roztoku v jednotkách M, A je absorbance při vlnové délce 280 nm, ε je molární absorpční koeficient analyzovaného roztoku při vlnové délce 280 nm v jednotkách 1/M·cm a l tloušťka absorpčního prostředí v jednotkách cm. Přístroj

neuvedl molární koncentraci, ale koncentraci hmotnostní (jednotka mg/ml), kterou přepočtl na základě zadané relativní molekulové hmotnosti proteinu *EcDOS*.

V databázi proteinů UniProt (<https://www.uniprot.org/>) byla vyhledána sekvence aminokyselin proteinu *EcDOS*, následně bylo využito programu ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>), pomocí kterého byla určena teoretická hodnota relativní molekulové hmotnosti (pro protein *EcDOS* $M_r = 93\ 004$) a molárního absorpčního koeficientu (pro protein *EcDOS* $\epsilon = 95\ 840\ \text{l/M}\cdot\text{cm}$). Nejdelší optická dráha paprsku světla na spektrofotometru DS-11 DeNovix je 0,5 mm.

Jako „blank“ byla použita deionizovaná voda, jejíž 2,0 μl byly umístěny na detekční plochu spektrofotometru. Následně byla deionizovaná voda odstraněna z detekční plochy spektrofotometru a byly aplikovány 2,0 μl roztoku proteinu *EcDOS* za účelem určení jeho absorbance při 280 nm a stanovení koncentrace finálního preparátu proteinu *EcDOS*.

3.3.6 Polyakrylamidová elektroforéza v prostředí dodecylsírany sodného

Dvě skla určena pro elektroforézu byla předem odmaštěna pomocí ethanolu a byla umístěna naproti sobě do stojanu elektroforetické aparatury (Mini-PROTEAN Tetra Handcast Systems, BIO RAD). Nejprve byl připraven roztok pro 10% separační gel, který vznikl smícháním 3,3 ml pufru A (0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% (w/v) dodecylsírany sodný (SDS)), 1,7 ml polymerizačního roztoku A (30% (w/v) akrylamid, 0,8% (w/v) N, N-methylen-bis-akrylamid v pufru A), 5,0 μl N, N, N', N'-tetramethylethylendiimin a 50 μl peroxosírany amonného (100 mg/ml). Po zamíchání byl roztok převeden do prostoru mezi skly, následně byl překryt deionizovanou vodou a nechán 30 minut polymerovat. Po vytvoření separačního gelu byla voda slita a přebytečná voda vysušena pomocí filtračního papíru. Poté byl separační gel převrstven roztokem, z kterého posléze vznikl 4% zaostřovací gel. Tento roztok nezbytný pro vznik 4% zaostřovacího gelu vznikl smícháním 1,7 ml pufru B (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% (w/v) SDS), 267 μl polymerizačního roztoku B (30% (w/v) akrylamid, 0,8% (w/v) N-methylen-bis-akrylamid v pufru B), 2,0 μl N, N, N', N'-tetramethylethylendiimin a 40 μl peroxosírany amonného (100 mg/ml). Do tohoto roztoku byl ihned po jeho aplikaci na 10% separační gel vložen hřeben, aby se vytvořily jamky a opět byl i tento roztok ponechán polymerovat 30 minut. Následně byl připravený akrylamidový gel (složený ze zaostřovací a separační části)

přemístěn do vany elektroforetické aparatury, která byla naplněna elektrodoým pufrem (0,025 M Tris-HCl, 0,192 M Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3). Vzorky odebrané v průběhu exprese a izolace proteinu *EcDOS* byl vhodně zředěny a smíchány s adekvátním množstvím čtyřikrát koncentrovaného redukujícího pufru (0,25 M Tris-HCl, pH 6,8, 8% (w/v) SDS, 40% (v/v) glycerolu, 20% (v/v) 2-merkapt ethanol, 0,012% (w/v) bromfenolová modř), přesné složení výsledných roztoků vizte tabulka č. 1, strana č. 39. Výsledné roztoky byly 5 minut zahřáty v inkubátoru (Mini Heating Dry Bath Incubator, MD-MINI, Major Science) při teplotě 100 °C a následně odstředěny na stolní minicentrifuze, 6 000 RPM (Minicentrifuga myFuge Mini, Benchmark Scientific). Do vzniklých jamek zaostřovacího gelu bylo nanášeno 10 µl standardu (Precision Plus Protein™ Standards) a výsledné roztoky vzorků (vizte tabulka č. 1, strana č. 39). Poté byla elektroforetická aparatura uzavřena a připojena ke zdroji elektrického napětí (EPS 301, Electrophoresis Power Supply, Amersham Pharmacia Biotech). SDS-PAGE probíhala 70 minut při napětí 200 V. Po ukončení SDS-PAGE byl gel umístěn do Petriho misky a zaostřovací gel s jamkami byl odstraněn. Do Petriho misky se separačním gelem byl vložen barvicí roztok InstantBlue™ Protein Stain (Expedeon, Německo) a inkubace probíhala přes noc za stálého míchání (Wisd WiseShake SHO, Witeg). Poté byl gel promyt destilovanou vodou. Nakonec byly výsledky separace zaznamenány (Perfection V550 Photo, Epson) a vyhodnoceny.

Tabulka č. 1: Příprava vzorků pro SDS-PAGE.

Typ vzorku	Ředění	Objem odebraného vzorku [μl]	Objem deionizované vody [μl]	Objem vzorkového pufru [μl]	Odebraný objem [μl]	Hmotnost proteinu v jamce [μg]
Buňky <i>E. coli</i> před indukcí IPTG	8×	10	20	50	10	neurčeno
Buňky <i>E. coli</i> po indukcí IPTG	8×	10	20	50	10	neurčeno
Cytosolární frakce buněk <i>E. coli</i>	4×	10	20	10	10	neurčeno
Protein <i>EcDOS</i> po afinitní chromatografii	1×	30	0	10	10	neurčeno
Finální preparát proteinu <i>EcDOS</i>	20×	0,2	1,3	0,5	2	0,68
	8×	0,5	3,25	1,25	5	1,7
	4×	1	6,5	2,5	10	3,4

3.3.7 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Za účelem testování enzymové aktivity *EcDOS* za různých podmínek byly připraveny následující inkubační směsi. Jednotlivé inkubační směsi obsahovaly 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM c-di-GMP, 0,2 μM *EcDOS* (vizte kapitola 3.3.4) a případně 100 μM a 50 μM inhibitory a/nebo rozpouštědlo a/nebo 1 mM činidlo (Na₂S₂O₄) redukující iont železa hemu *EcDOS* a 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, ve výsledném objemu 100 μl.

Do 14 zkumavek Eppendorf, které byly očíslovány 1-14 a toto číslo zároveň označovalo číslo reakce, byly pipetovány jednotlivé složky reakční směsi dle tabulky č. 2, strana č. 41. Jednotlivé enzymové reakce byly zahájeny přidáním poslední složky, substrátu. Všechny vzorky byly inkubovány při teplotě 25 °C po dobu 20 min. Následně byly enzymové reakce ukončeny přidáním 1 μl CaCl₂ (výsledná koncentrace 10 mM). Vzorky byly před analýzou pomocí vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC) krátce centrifugovány na stolní minicentrifuze, 6 000 RPM (Minicentrifuga myFuge Mini, Benchmark Scientific). Poté bylo 10 μl jednotlivých vzorků vstříknuto na kolonu a analyzováno pomocí přístroje HPLC (Agilent 1200 Series, kolona Luna® 5 μm C18(2) 100 Å, LC Column 150 x 4.6 mm, Ea) se spektrofotometrickou detekcí vlnové délky při 254 nm. Mobilní fáze byly pufr A (0,1 M KH₂PO₄, pH 6,0, 4 mM tetrabutyl amonium hydrogen sulfát, pH 6,0) a pufr B (75 % (v/v) pufr A, 25 % (v/v) methanol). Průtoková rychlost mobilní fáze byla 0,7 ml/min a byl vytvořen gradient mobilní fáze v čase 0 minut 40 % (v/v) pufr B a 60 % (v/v) pufru A, v čase 15 minut 100 % (v/v) pufru B, v čase 20 minut 100 % (v/v) pufru B a v čase 21 minut 40 % (v/v) pufru B a 60 % (v/v) pufru A. Pro detekci substrátu (c-di-GMP) a produktu (l-di-GMP) bylo využito sledování hodnoty absorbance při 254 nm. Popsaná analýza byla pro každý vzorek provedena třikrát. Získaná data byla zpracována pomocí programu Excel.

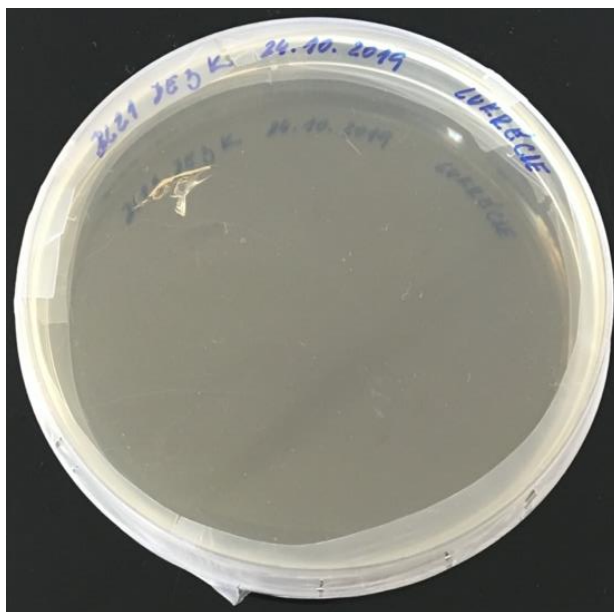
Tabulka č. 2: Složení reakčních směsí připravených za účelem stanovení enzymové aktivity proteinu *EcDOS* za různých podmínek.

Číslo reakce	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Chemikálie	Odebrané objemy zásobních roztoků [μl]													
500 mM NaCl	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
50 mM MgCl ₂	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
0,1 mM c-di-GMP	10	0	10	10	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10
37 μM <i>EcDOS</i>	0	5,4	5,4	0	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4
Na ₂ S ₂ O ₄	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
DMSO	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
10 mM Artenusate v DMSO	0	0	0	0	0	0	0	1	0,5	0	0	0	1	0
10 mM MSU-39446 (HC106) v DMSO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,5	0	1
50 mM Tris-HCl, pH 8,0	70,0	74,6	64,6	69,0	73,6	63,6	62,6	62,6	63,1	62,6	62,6	63,1	62,6	62,6

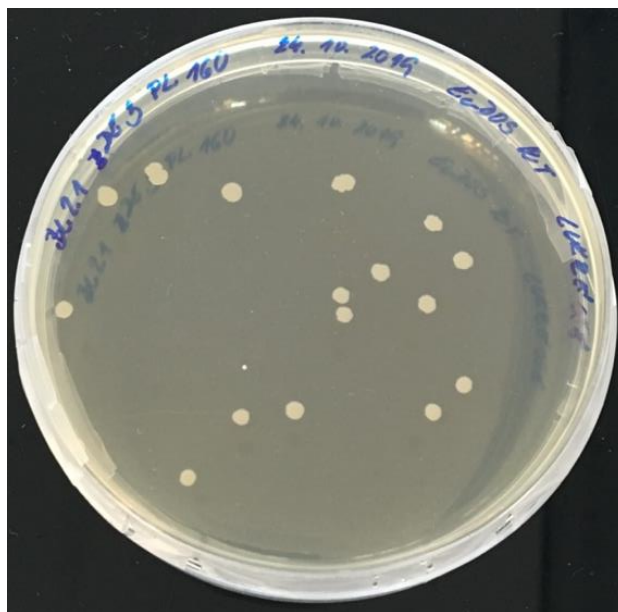
4 Výsledky

4.1 Transformace buněk *E. coli* BL-21 (DE3) plasmidem pET-28a(+)/*EcDOS*

Buňky *E. coli* kmene BL-21 (DE3) byly transformovány plasmidem pET-28a(+)/*EcDOS* (dle postupu vizte 3.3.2). Úspěšnost transformace buněk *E. coli* byla posouzena analýzou agarových ploten. Na kontrolní agarové plotně obsahující antibiotikum kanamycin se žádné kolonie buněk *E. coli* kmene BL-21 (DE3) bez transformace plasmidem pET-28a(+)/*EcDOS* nevyskytovaly ani po několikahodinové inkubaci (vizte obrázek č. 9, strana č. 43). Buňky *E. coli* kmene BL-21 (DE3) transformované plasmidem pET-28a(+)/*EcDOS* (který kromě genu pro *EcDOS* obsahuje také gen zásadní pro rezistenci vůči kanamycinu) na druhé agarové plotně s antibiotikem kanamycin, vytvořily po několikahodinové inkubaci zřetelné buněčné kolonie (vizte obrázek č. 10, strana č. 44). Transformace buněk *E. coli* plasmidem pET-28a(+)/*EcDOS* proběhla úspěšně.



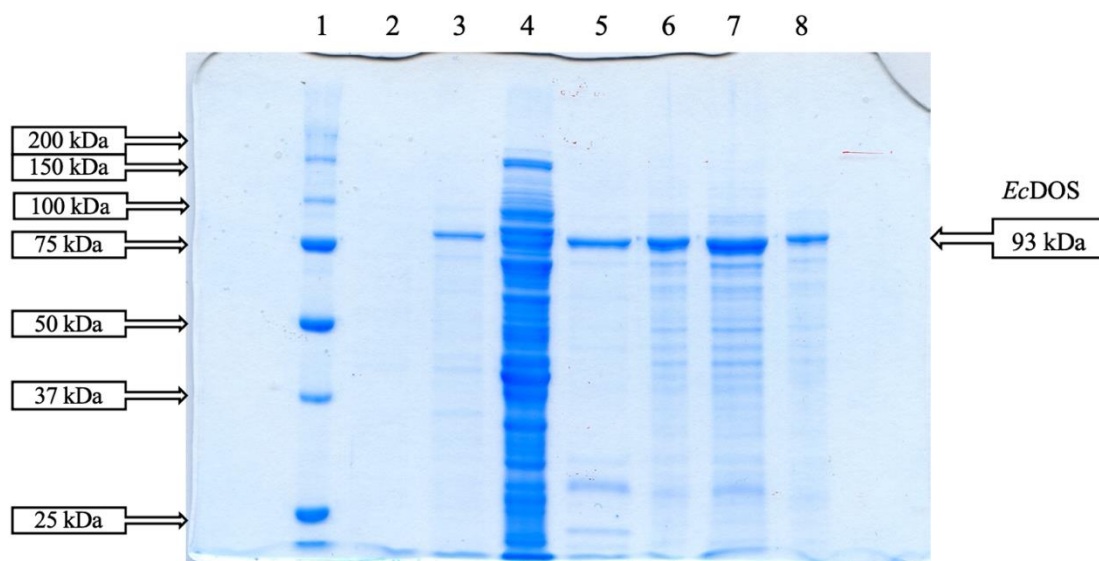
Obrázek č. 9: Kontrolní kanamycinová agarová plotna s buňkami *E. coli* BL-21 (DE3) bez transformace plasmidem pET-28a(+)/*EcDOS*. Za daných podmínek nejsou pozorovány žádné buněčné kolonie.



Obrázek č. 10: Kanamycinová agarová plotna s koloniemi buněk *E. coli* BL-21 (DE3), které byly transformovány plasmidem pET-28a(+)/*EcDOS*. Tento plasmid kromě genu pro *EcDOS* obsahuje také gen pro rezistenci vůči kanamycinu.

4.2 Exprese proteinu *EcDOS*

Expresa proteinu *EcDOS* byla uskutečněna dle postupu v kapitole 3.3.3. Je zajímavé, že přestože transformované buňky *E. coli* BL-21(DE3) měly dosáhnout požadované optické denzity (tj. OD_{600} v rozmezí 0,6 až 1,2) po přibližně 3 hodinách, v našem případě byla optická denzita OD_{600} po 3 hodinách inkubace rovna 0,3 a požadované hodnoty optické denzity dosáhla směs až po 3,5 hodinách, kdy hodnota tohoto parametru byla 0,7. Celkový výtěžek buněk *E. coli* BL-21(DE3) s exprimovaným proteinem *EcDOS* byl 7,0 g, toto množství bylo získáno z 1 l TB média. Před indukcí a po indukci exprese proteinu *EcDOS* byly odebrány vzorky pro SDS-PAGE (vizte postup 3.3.6). Do dráhy č. 2 elektroforetického gelu byl nanesen vzorek buněk *E. coli* před indukcí exprese proteinu *EcDOS* (vizte obrázek č. 11, strana č. 45). Pro srovnání je pak v dráze č. 3 (vizte obrázek č. 11, strana č. 45) analyzován vzorek buněk *E. coli* po indukci exprese proteinu *EcDOS* pomocí IPTG v srovnatelné koncentraci (vizte postup 3.3.3). Z tohoto srovnání je patrný jednoznačný rozdíl v obou vzorcích spočívající v přítomnosti proteinu s molekulovou hmotností přibližně 90 kDa po indukci exprese proteinu *EcDOS*, jehož gen se nacházel na plasmidu pET-28a(+)/*EcDOS*. Pozorovaný protein odpovídá svojí molekulovou hmotností proteinu *EcDOS*. Je tedy velmi pravděpodobné, že exprese proteinu *EcDOS* proběhla úspěšně.



Obrázek č. 11: Analýza vzorků odebraných během exprese a izolace proteinu *EcDOS* pomocí SDS-PAGE. Detaily vizte kapitola 3.3.6, tabulka č. 1, strana č. 39.

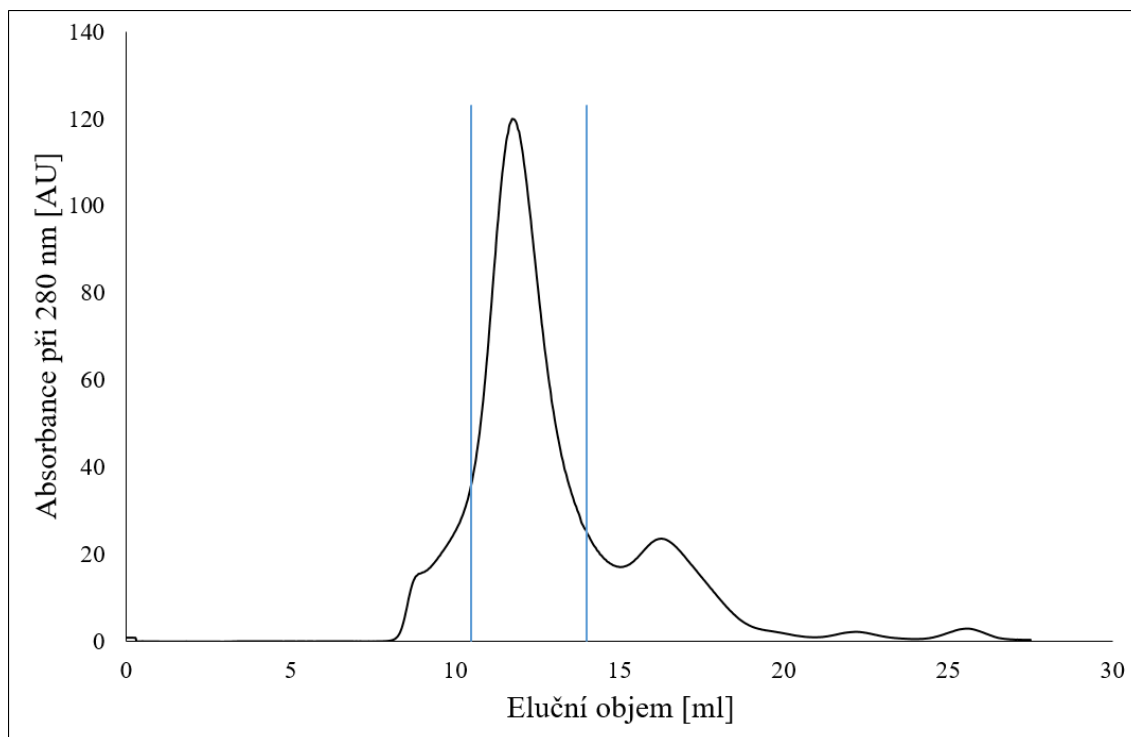
- 1: Standard Precision Plus Protein™ Standards, 10 μ l
- 2: Buňky *E. coli* před indukcí exprese proteinu pomocí IPTG, 8 \times ředěno, 10 μ l
- 3: Buňky *E. coli* po indukcii exprese proteinu pomocí IPTG, 8 \times ředěno, 10 μ l
- 4: Cytosolární frakce buněk *E. coli*, 4 \times ředěno, 10 μ l
- 5: Protein *EcDOS* po afinitní chromatografii, 1 \times ředěno, 10 μ l
- 6: Finální preparát proteinu *EcDOS*, 8 \times ředěno, 1,7 μ g, 5 μ l
- 7: Finální preparát proteinu *EcDOS*, 4 \times ředěno, 3,4 μ g, 10 μ l
- 8: Finální preparát proteinu *EcDOS*, 20 \times ředěno, 0,7 μ g, 2 μ l

4.3 Izolace proteinu *EcDOS*

V průběhu izolace proteinu *EcDOS* byly odbírány vzorky, které byly následně analyzovány pomocí metody SDS-PAGE (vizte kapitola 3.3.6). Detaily postupu této analýzy jsou zaznamenány v tabulce č. 1, strana č. 39. Izolace proteinu *EcDOS* byla provedena dle postupu, který je detailně popsán v kapitole 3.3.4. Analýza supernatantu buněk *E. coli* po jejich lýzi a ultracentrifugaci je znázorněna v dráze č. 4 na elektroforetickém gelu (vizte obrázek č. 11, strana č. 45). Je patrné velké množství bakteriálních proteinů, které se fyziologicky nacházejí v cytosolu bakterií. Z této směsi byl rekombinantně exprimovaný protein *EcDOS* dále izolován pomocí afinitní chromatografie s využitím histidinové kotvy uměle přidané na konec přirozené sekvence proteinu *EcDOS*. Vzorek eluátu z afinitního nosiče, jehož eluce byla vyvolána 200 mM imidazolem je znázorněna v dráze č. 5 (vizte obrázek č. 11, strana č. 45). V dráze č. 5 je

patrná majoritní přítomnost proteinu, jehož mobilita za podmínek SDS-PAGE odpovídá mobilitě proteinu s molekulovou hmotností přibližně 90 kDa. Vzhledem k tomu, že teoretická molekulová hmotnost proteinu *EcDOS* je 93 kDa, je pravděpodobné, že izolace *EcDOS* afinitní chromatografií byla úspěšná (vizte obrázek č. 11, strana č. 45). Finálním krokem izolace byla gelová chromatografie za účelem odstranění imidazolu z předchozího izolačního kroku a také balastních proteinů, případně také vysokomolekulárních agregátů proteinů *EcDOS* (vizte kapitola 3.3.4). V průběhu gelové chromatografie byly jímány jednotlivé frakce a byla měřena absorbance při 280 nm. Frakce obsahující proteiny s molekulovou hmotností odpovídající proteinu *EcDOS* byly odebrány v intervalu elučních objemů 10,5 až 14 ml (vizte obrázek č. 12, strana č. 47)

Koncentrace finálního preparátu proteinu *EcDOS* byla 3,4 mg/ml, což odpovídá molární koncentraci 37 μ M. Celkové množství purifikovaného proteinu *EcDOS* je 0,8 mg. Výtěžek je 0,11 mg/g buněk *E. coli* a 0,8 mg/l TB média. Na obrázku č. 11, strana č. 45, v drahách č. 6, 7 a 8 je analyzován finální preparát proteinu *EcDOS* v různých koncentracích. Je patrná přítomnost dominantního proteinu s mobilitou srovnatelnou s mobilitou proteinu s molekulovou hmotností cca 90 kDa resp. mobilitou nižší než standardní protein s molekulovou hmotností 75 kDa a vyšší než standardní protein s molekulovou hmotností 100 kDa. Jak již bylo uvedeno výše, vzhledem k tomu, že teoretická molekulová hmotnost proteinu *EcDOS* je 93 kDa, je velmi pravděpodobné, že námi izolovaný protein je skutečně protein *EcDOS*. Intenzita linie odpovídá koncentraci proteinu aplikovaného do dané dráhy. Čistotu finálního preparátu lze odhadnout na cca 95 %, protože je patrné, že ve finálním preparátu je cca 5 % balastních proteinů. Tyto interference jsou nejvíce zjevné v dráze č. 7 (vizte obrázek č. 11, strana č. 45), kam bylo naneseno největší množství finálního preparátu *EcDOS*.



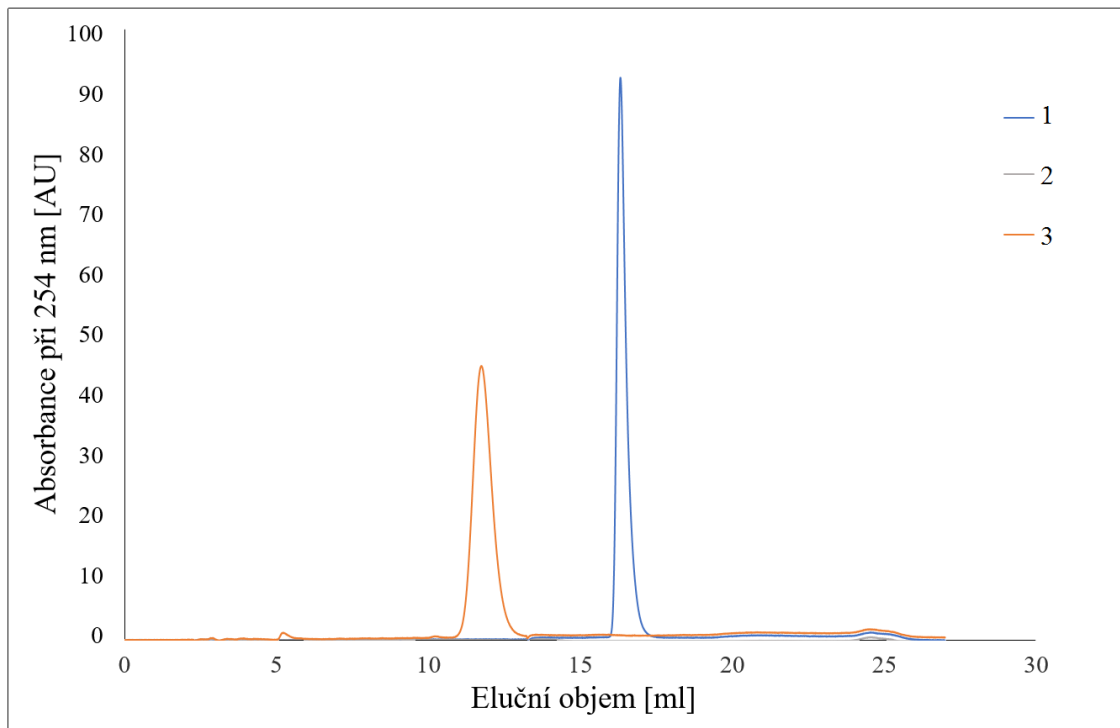
Obrázek č. 12: Chromatogram preparátu obsahujícího protein *EcDOS* analyzovaný pomocí metody gelové chromatografie. Byla měřena absorbance při 280 nm pomocí spektrofotometru a byly jímány frakce, které obsahovaly finální preparát proteinu *EcDOS* v intervalu elučních objemů 10,5 až 14 ml (znázorněn modrými čarami). Detailní podmínky analýzy vizte kapitola 3.3.4.

4.4 Testování enzymové aktivity proteinu *EcDOS*

Jednotlivé reakční směsi, připravené dle postupu v kapitole 3.3.7 a informací v tabulce č. 2 na straně č. 41, byly analyzovány pomocí HPLC.

Analýzou reakční směsi obsahující *EcDOS* s iontem železa hemu v oxidovaném stavu [Fe(III)] a substrát reakce c-di-GMP (reakce č. 3, značena oranžovou křivkou, eluční objem produktu reakce 11,7 ml), a kontrolních reakcí tj. reakční směsi bez substrátu c-di-GMP (reakce č. 2, značena šedivou křivkou) a/nebo bez enzymu *EcDOS* (reakce č. 1, označena modrou křivkou, eluční objem substrátu reakce 16,3 ml) (vizte obrázek č. 13, strana č. 48) bylo zjištěno, že *EcDOS* s iontem železa hemu v oxidovaném stavu [Fe(III)] je plně enzymově aktivní. Enzymová reakce katalyzovaná proteinem *EcDOS* proběhla a všechny substrát c-di-GMP byl přeměněn na produkt, tj. l-di-GMP (schéma této reakce vizte obrázek č. 6, strana č. 22). Pokud reakční směs obsahuje enzym a jeho substrát (vizte oranžová křivka, reakce č. 3) tvoří se nová látka s elučním objemem cca 11,7 ml. Je pravděpodobné, že tento pík odpovídá produktu reakce, tj. l-di-GMP, protože se jeho eluční objem zásadně liší od elučního objemu substrátu reakce (c-di-GMP) – vizte modrou křivku, kontrolní reakci č. 1 odpovídající reakční

směsi bez enzymu a píku při 16,3 ml. Reakční směs bez substrátu (vizte šedivá křivka, kontrolní reakce č. 2) nezobrazuje žádný signifikantní pík.

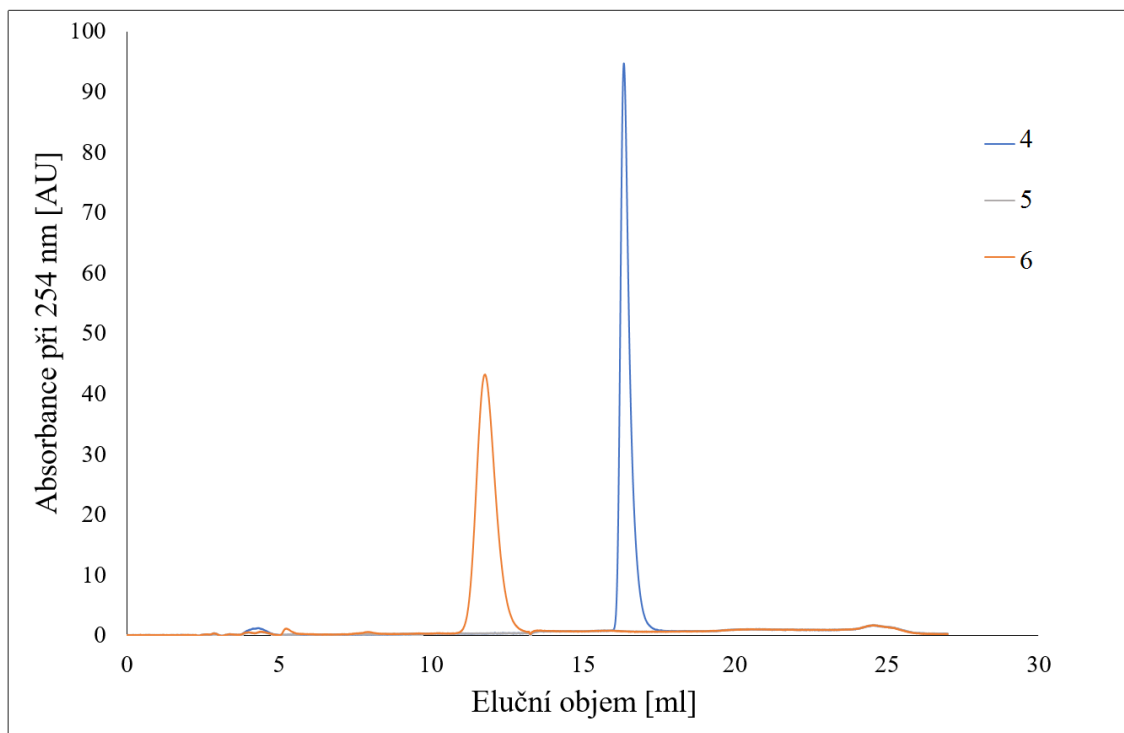


Obrázek č. 13: HPLC analýza inkubačních směsí proteinu *EcDOS* s iontem železa hemu v oxidovaném stavu [Fe(III)] za účelem stanovení jeho enzymové aktivity. Modrá křivka 1 znázorňuje analýzu c-di-GMP z kontrolní reakce, která obsahovala pouze substrát bez enzymu. Šedivá křivka 2 představuje kontrolní reakci, která obsahovala pouze enzym *EcDOS* s iontem železa hemu v oxidovaném stavu [Fe(III)] bez substrátu. Oranžová křivka 3 znázorňuje produkt enzymové reakce, 1-di-GMP, který vznikl inkubací směsi obsahující *EcDOS* s iontem železa hemu v oxidovaném stavu [Fe(III)] a substrát c-di-GMP.

Analýza reakční směsi obsahující *EcDOS* s iontem železa hemu v redukovaném stavu [Fe(II)] a substrát reakce c-di-GMP (reakce č. 6, označena oranžovou křivkou, eluční objem produktu reakce 11,7 ml,) a analýza kontrolních reakcí tj. reakční směsi bez substrátu c-di-GMP (reakce č. 5, značena šedivou křivkou) a/nebo bez enzymu *EcDOS* (reakce č. 4, značena modrou křivkou, eluční objem substrátu reakce 16,3 ml) je znázorněna na obrázku č. 14, strana č. 49. Stejně jako v případě enzymové reakce katalyzované proteinem *EcDOS* s iontem železa hemu v oxidovaném stavu [Fe(III)] bylo zjištěno, že *EcDOS* s iontem železa hemu v redukovaném stavu [Fe(II)] je plně aktivní. Také eluční objemy píků analyzovaných reakčních směsí jsou téměř shodné s elučními objemy píků analyzovaných reakčních směsí z předchozího experimentu (vizte odstavec výše). Redukce iontu železa hemu proteinu *EcDOS* byla uskutečněna pomocí dithioničitanu sodného. Dithioničitan sodný nezměnil eluční objem substrátu (16,3 ml) ani eluční objem produktu (11,7 ml). Nejen eluční objemy, ale také plochy píků substrátu

a produktu jsou podobné jako v případě předchozího experimentu (vizte odstavec výše). Lze tedy říci, že redukční činidlo dithioničitan sodný neměl zásadní vliv na eluční objemy c-di-GMP a l-di-GMP ani na jejich plochy píků.

Lze tedy shrnout, že připravený preparát *EcDOS* je plně enzymově aktivní, a to jak ve své oxidované formě (vizte obrázek č. 13, strana č. 48), tak i ve své redukované formě iontu železa hemu (vizte obrázek č. 14, strana č. 49).

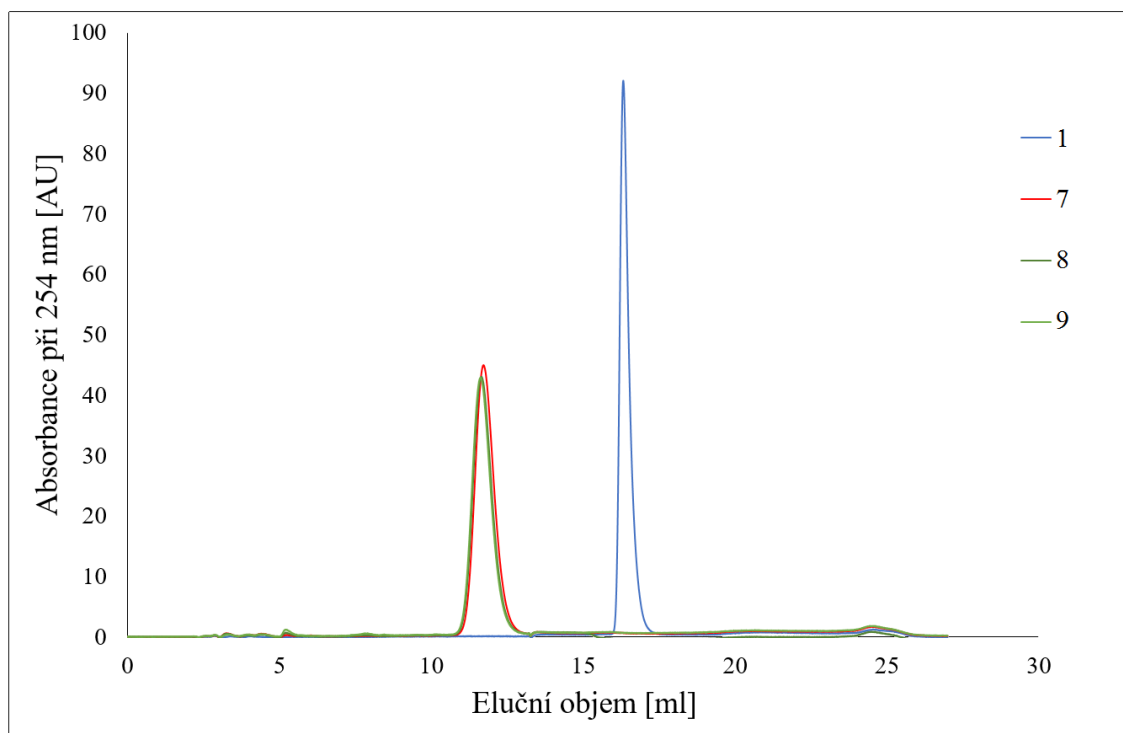


Obrázek č. 14: HPLC analýza inkubačních směsí proteinu *EcDOS* s iontem železa hemu v redukováném stavu [Fe(II)] za účelem stanovení jeho enzymové aktivity. Modrá křivka 4 znázorňuje c-di-GMP z kontrolní reakci, která obsahovala pouze substrát bez enzymu. Šedivá křivka 5 představuje kontrolní reakci, která obsahovala pouze enzym *EcDOS* s iontem železa hemu v redukováném stavu [Fe(II)] bez substrátu. Oranžová křivka 6 znázorňuje produkt enzymové reakce, l-di-GMP, který vznikl inkubací směsi obsahující *EcDOS* s iontem železa hemu v redukováném stavu [Fe(II)] a substrát c-di-GMP.

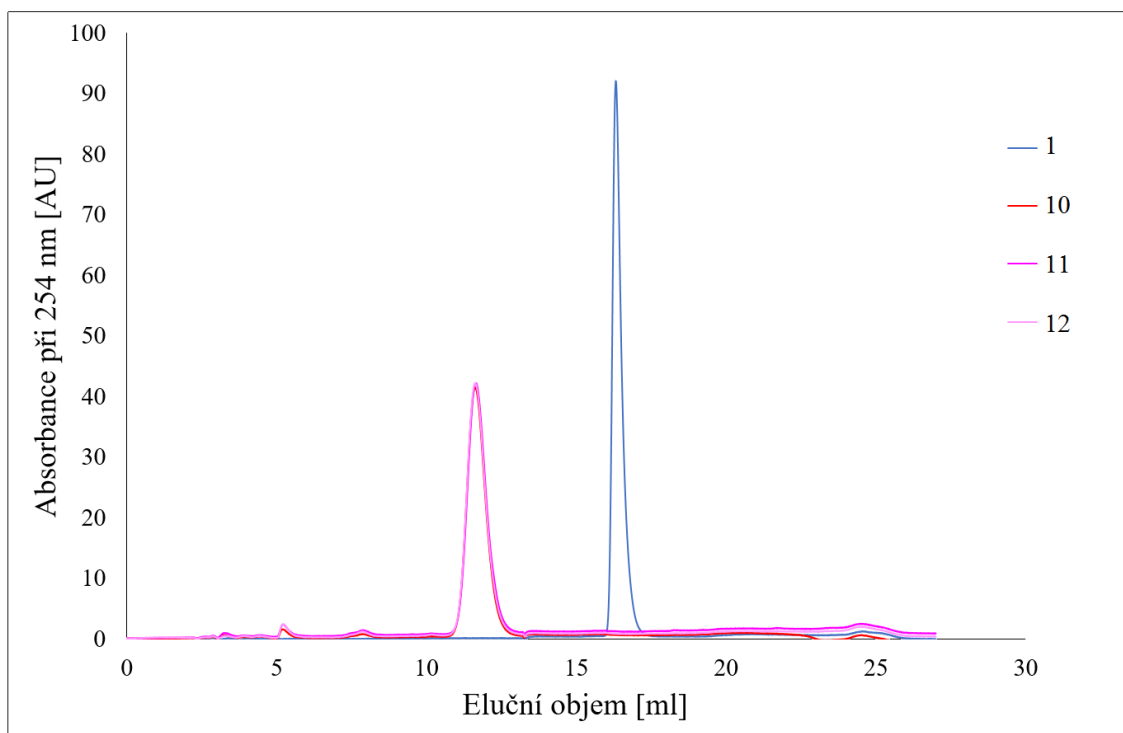
4.5 Vliv potenciálních inhibitorů

Byl testován vliv potenciálních inhibitorů proteinu *EcDOS*, konkrétně Artenusate a MSU-39446 (HC106), na enzymovou aktivitu *EcDOS* a to jak v jeho oxidované formě (obsahující ion železa hemu ve stavu Fe(III)), tak i v jeho redukované formě (obsahující ion železa ve stavu Fe(II)). Bylo zjištěno, že za zvolených experimentálních podmínek inhibitory Artenusate a MSU-39446 (HC106) neměly vliv na enzymovou aktivitu proteinu *EcDOS* v žádném z jeho testovaných stavů (vizte obrázky č. 15, 16 a 17, strana č. 50–52). Ve všech případech je zjevné, že všechen substrát (c-di-GMP) je přeměněn na

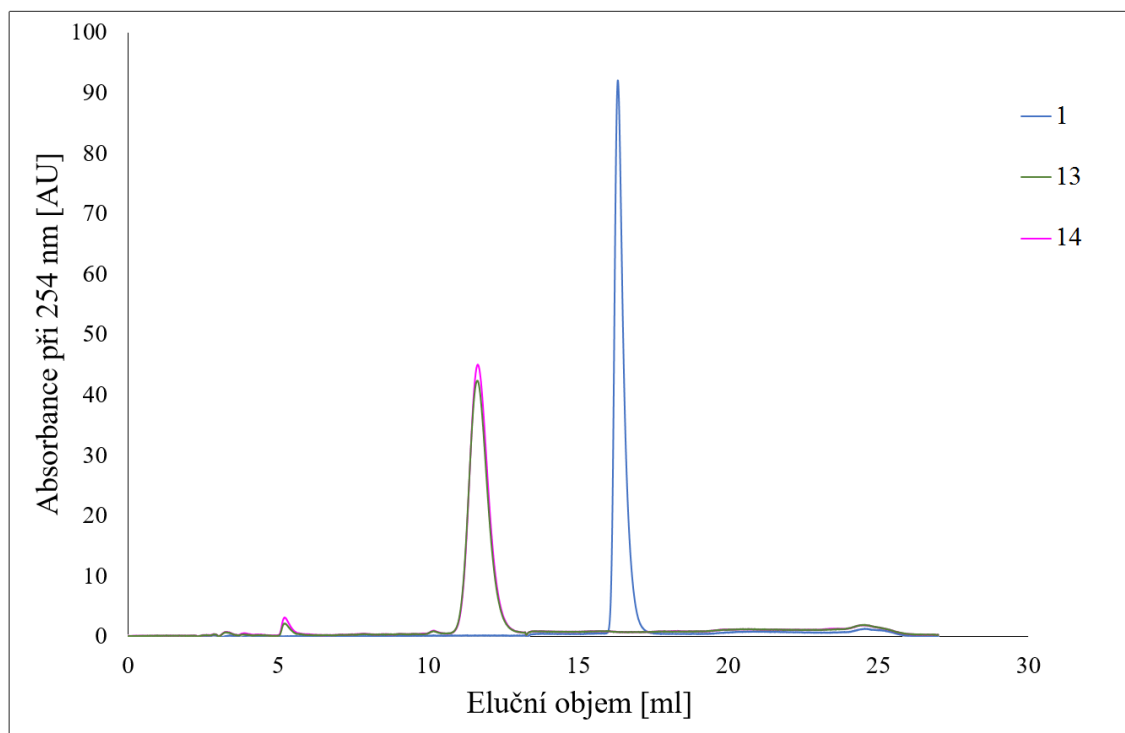
produkt reakce (1-di-GMP), schéma této reakce vizte obrázek č. 6, strana č. 22. Analogické závěry byly učiněny v experimentech bez potenciálních inhibitorů (vizte předchozí kapitola). Analýzou kontrolních reakcí bylo zjištěno, že rozpouštědlo DMSO neinterferuje s reakcí a také nemá vliv na enzymovou aktivitu proteinu *EcDOS*.



Obrázek č. 15: HPLC analýza inkubačních směsí proteinu *EcDOS* v jeho redukované formě za účelem testování vlivu potenciálního inhibitoru Artesunate na enzymovou aktivitu *EcDOS*. Modrá křivka 1 představuje analýzu c-di-GMP z kontrolní reakce. Červená křivka 7 znázorňuje kontrolní reakci obsahující *EcDOS* s iontem železa hemu v redukováném stavu [Fe(II)], substrát reakce c-di-GMP a rozpouštědlo DMSO. Tmavě zelená křivka 8 představuje *EcDOS* s iontem železa hemu v redukováném stavu [Fe(II)], substrát reakce c-di-GMP a potenciální inhibitor Artesunate rozpuštěný v DMSO o výsledné koncentraci 100 μM . Světle zelená křivka 9 znázorňuje totéž jako tmavě zelená křivka, liší se pouze ve výsledné koncentraci inhibitoru Artesunate rozpuštěného v DMSO, která je 50 μM .



Obrázek č. 16: HPLC analýza inkubačních směsí proteinu *EcDOS* v jeho redukované formě za účelem testování vlivu potenciálního inhibitoru MSU-39446 (HC106) na enzymovou aktivitu *EcDOS*. Modrá křivka 1 představuje analýzu c-di-GMP z kontrolní reakce. Červená křivka 10 znázorňuje kontrolní reakci obsahující *EcDOS* s iontem železa hemu v redukováném stavu [Fe(II)], substrát reakce c-di-GMP a rozpouštědlo DMSO. Tmavě růžová křivka 11 představuje *EcDOS* s iontem železa hemu v redukováném stavu [Fe(II)], substrát reakce c-di-GMP a potenciální inhibitor MSU-39446 (HC106) rozpuštěný v DMSO o výsledné koncentraci 100 μM . Světle růžová křivka 12 znázorňuje totéž jako tmavě růžová křivka, liší se pouze ve výsledné koncentraci inhibitoru MSU-39446 (HC106) rozpuštěného v DMSO, která je 50 μM .



Obrázek č. 17: HPLC analýza inkubačních směsí proteinu *EcDOS* v jeho oxidované formě za účelem testování vlivu potenciálních inhibitorů Artesunate a MSU-39446 (HC106) na enzymovou aktivitu *EcDOS*. Modrá křivka 1 znázorňuje analýzu c-di-GMP z kontrolní reakce. Tmavě zelená křivka 13 představuje *EcDOS* s iontem železa hemu v oxidovaném stavu [Fe(III)], substrát reakce c-di-GMP a potenciální inhibitor Artesunate rozpuštěný v DMSO o výsledné koncentraci 100 μ M. Tmavě růžová křivka 14 znázorňuje totéž jako tmavě zelená křivka, liší se v použitém inhibitoru, kterým byl MSU-39446 (HC106) rozpuštěný v DMSO o výsledné koncentraci 100 μ M.

5 Diskuze

Hemové sensorové proteiny se dělí na hemové sensorové proteiny, které detekují hem a na hemové sensorové proteiny, které detekují plyny. Obě tyto skupiny hrají významnou roli při regulaci několika fyziologických funkcí. Hemové sensorové proteiny, které detekují hem, se vyskytují převážně v eukaryotních buňkách a mohou mít vliv na regulaci transkripce a translace [4]. Příkladem regulace hemových sensorových proteinů, které detekují plyny, může být regulace enzymové aktivity, konkrétně kinasové, fosfodiesterasové a guanylátcyklasové a tyto proteiny jsou naopak typické pro bakterie (prokaryota) [4,6]. O mechanismu působení hemových sensorových proteinů není dosud dostatek informací, přestože hemové sensorové proteiny představují slibný cíl terapeutického zásahu. Hlavním předmětem zájmu je mechanismus přenosu signálu ze sensorové do funkční domény, kterou hemové sensorové proteiny obsahují [4]. Bakteriální senzory jsou vhodnými modelovými systémy, protože se teoreticky lépe připravují než sensorové systémy eukaryot, příkladem může být HRI [47]. Pro bakalářskou práci byl zvolen prokaryotní sensorový systém, konkrétně hemový sensorový protein, který detekuje plyny s názvem *EcDOS*. Funkční doména *EcDOS* má fosfodiesterasovou aktivitu, pomocí které dochází k regulaci fyziologických funkcí, např. buněčné diferenciaci a virulenci [23,24]. Protein *EcDOS* byl vybrán, protože v naší laboratoři ještě nebyl studován. Nejvíce byly doposud studovány hemové sensorové systémy s globinovou sensorovou doménou mezi jejichž zástupce patří YddV [48] a histidinkinasa s globinovou strukturou sensorové domény z *Anaeromyxobacter sp.* Fw 109-5 (*AfGCHK*) [49]. Pro komplexnější zmapování a doplnění informací o zástupcích hemových sensorových proteinů, které detekují plyny, bylo nutné studovat i hemové sensorové systémy s PAS doménou, kterou protein *EcDOS* obsahuje [28].

Byl k dispozici plasmid pET-28a(+)/*EcDOS*, který kromě genu našeho modelového proteinu obsahoval také gen pro rezistenci proti antibiotiku kanamycin. Proto bylo možné sledovat, zda transformace buněk *E. coli* tímto plasmidem proběhla úspěšně (vizte obrázek č. 10, strana č. 44). Protože na kontrolní agarovou plotnu obsahující antibiotikum kanamycin byly aplikovány buňky *E. coli* BL-21 (DE3) netransformované plasmidem a ani po několikahodinové inkubaci nedošlo k žádnému nárůstu buněčných kolonií (vizte obrázek č. 9, strana č. 43), bylo ověřeno, že použité buňky *E. coli* BL-21 (DE3) rezistenci proti kanamycinu přirozeně nemají. Teprve poté, až byly tyto buňky úspěšně transformovány daným plasmidem, se na agarové plotně

s kanamycinem objevily kolonie transformovaných buněk (vizte obrázek č. 10, strana č. 44).

Srovnáním míry exprese proteinu *EcDOS* s dalšími hemoproteiny, které byly v naší laboratoři připravovány, je patrné, že míra exprese prokaryotních proteinů je vyšší než proteinů eukaryotních. Srovnání bylo učiněno porovnáním elektroforetických analýz vzorků buněk *E. coli* BL-21 (DE3) před indukcí exprese daného rekombinantního proteinu a po tomto kroku. Míra exprese prokaryotních proteinů *AfGcHK* [50] a *YddV* [51] byla větší než míra exprese proteinu *EcDOS*. Naopak míra exprese eukaryotního proteinu *HRI* [52] byla nižší. Analogické závěry, jako o míře exprese, lze učinit při porovnání množství buněk *E. coli* exprimující buď prokaryotní nebo eukaryotní protein.

Výše diskutovaná analýza míry exprese cílového proteinu *EcDOS* v buňkách *E. coli* BL-21 (DE3) přinesla ještě jeden pozoruhodný aspekt. Na záznamu SDS-PAGE v dráze č. 2 (vizte obrázek č. 11, strana č. 45), která představuje buňky *E. coli* před indukcí exprese proteinu *EcDOS* pomocí IPTG, nejsou totiž patrné žádné výrazné linie, na rozdíl od dráhy č. 3 (vizte obrázek č. 11, strana č. 45), která obsahuje buňky *E. coli* po indukcí exprese proteinu pomocí IPTG. Lze se domnívat, že důvod, proč v dráze č. 2 nejsou viditelné žádné linie je, že vzorek před indukcí mohl být odebrán po původně plánovaných 3 hodinách, kdy ještě nebylo dostatečné množství buněk v preparátu. Další možnost, která by danou diskrepanci vysvětlila, spočívá v tom, že vzorek nebyl před aplikací do elektroforetického gelu dostatečně promíchán.

Plasmid pET-28a(+)/*EcDOS* byl mimo jiné zvolen pro náš výzkum také z toho důvodu, aby exprimovaný protein *EcDOS* obsahoval sekvenci šesti za sebou následujících histidinů, tzv. histidinovou kotvu. Histidinovou kotvu je schopen navázat afinitní nosič prostřednictvím kobaltnatých iontů, které jsou inkorporované ve struktuře afinitního nosiče [53]. Této vlastnosti je využito při afinitní chromatografii, kdy dochází k zachycení proteinu *EcDOS* pomocí histidinové kotvy k afinitnímu nosiči a následně je protein *EcDOS* z afinitního nosiče eluován pomocí imidazolu po oddělení balastních proteinů. Zvolená strategie byla v případě proteinu *EcDOS* úspěšná a došlo k poměrně výrazné purifikaci našeho preparátu, jak bude ještě více diskutováno níže. Podobná strategie izolace proteinu se v naší laboratoři osvědčila například pro *AfGcHK* [49] nebo *HRI* [47], naopak nebyla vhodná pro izolaci *YddV*, kde byla nakonec zvolena jiná kotva (protein, který váže maltosu), která kromě výhody během purifikačních fází izolace, také zvyšuje stabilitu původního proteinu [48].

Čistota finálního preparátu je odhadována na cca 95 %, lze tedy říci, že purifikace byla úspěšná. Dle SDS-PAGE je patrné, že ve finálním preparátu je cca 5 % balastních proteinů (vizte obrázek č. 11, dráha č. 6, 7 a 8, strana č. 45). Kontaminace proteinu *EcDOS* mohla být pravděpodobně způsobena bohatým zastoupením histidinů v aminokyselinové sekvenci bakteriálních proteinů, které byly spolu s *EcDOS* zachyceny afinitním nosičem při afinitní chromatografii. To znamená, že by se mohlo jednat o fragment *EcDOS*, který mohl vzniknout působením bakteriálních proteas. Část proteinu obsahující histidinovou kotvu mohla být zadržena afinitním nosičem (proto ta nižší molekulová hmotnost balastních proteinů) a druhá část bez histidinové kotvy se při promývání afinitního nosiče mohla odmyt. Pravděpodobnější je však bohaté zastoupení histidinů v bakteriálním proteinu.

Teoretická molekulová hmotnost proteinu *EcDOS* určena na základě jeho aminokyselinové sekvence je 93 kDa. Hodnota 93 kDa se nachází se v rozmezí molekulových hmotností 75–100 kDa a tedy také elektroforetická mobilita proteinu *EcDOS* by se měla pohybovat v rozmezí mobilit standardních proteinů s molekulovou hmotností 75 a 100 kDa (vizte obrázek č. 11, strana č. 45). Je tedy pravděpodobné, že námi exprimovaný protein byl právě protein *EcDOS*.

Již dříve bylo v literatuře popsáno, že *EcDOS* vytváří v roztoku několik oligomerních stavů, konkrétně monomer, dimer nebo tetramer. Oligomerní stav *EcDOS* byl studován na základě molekulových hmotností a velikostí elučních objemů získaných ze záznamu gelové chromatografie. Tetramer, monomer a dimer lze určit v řadě dle klesající molekulové hmotnosti a rostoucí hodnoty elučního objemu [54]. V našem případě, se při SDS-PAGE protein jeví logicky jako monomer, protože tepelná denaturace v prostředí SDS způsobí disociaci všech oligomerních stavů. Nicméně analýzou pomocí gelové chromatografie protein *EcDOS* vykazuje dimerní strukturu. Použitá chromatografická kolona byla kalibrována v předchozí práci naší laboratoře [48]. Pozorovaná dimerní struktura *EcDOS* je v souladu s předchozími publikovanými výsledky [54].

Po izolaci finálního preparátu proteinu *EcDOS* byla testována jeho enzymová aktivita. Všechny proměnné parametry enzymové reakce (teplota, doba inkubace, koncentrace substrátu apod.), byly zvoleny na základě předešlých studií [55]. Pro prvotní experiment byly zvolené podmínky vyhovující a bylo zjištěno, že připravený preparát *EcDOS* je plně enzymově aktivní, a to jak v případě oxidované formy iontu železa hemu

v sensorové doméně, tak také při redukci tohoto iontu. Nicméně, doba inkubace pro kinetické studie byla příliš dlouhá, všechnen substrát byl za uvedenou dobu přeměněn na produkt reakce. Pro přesnější studium enzymové kinetiky proteinu *EcDOS* bude v budoucnu třeba zjistit přesný časový průběh reakce a další experimenty provést v kratších časových intervalech. Za takových podmínek pak bude možné určit nejen přesné kinetické parametry, ale také lépe porovnat průběh reakce za různých podmínek (např. za různých redoxních stavů iontu železa hemu).

Výše uvedené zjištění, že studovaný preparát *EcDOS* je plně enzymově aktivní v jeho oxidované i redukované formě iontu železa hemu (vizte kapitola 4.4), bylo překvapivé. Z jiných výzkumů je známo, že pokud je porovnávána aktivita asociovaná s různým redoxním stavem iontu železa hemu, je více enzymově aktivní jeho redukovaná než jeho oxidovaná forma [56]. Největší aktivitu však vykazuje protein *EcDOS* s iontem železa hemu v redukované formě s navázaným ligandem. Tyto formy však v rámci předkládané bakalářské práce nebyly studovány. Daným ligandem může být O_2 [55], což není nijak překvapivé, jelikož se jedná o kyslíkový senzor. Překvapivé může být, že ještě vyšší aktivitu má *EcDOS* pokud je tímto ligandem místo O_2 CO [57]. V případě jiného modelového hemoproteinu YddV se jeho katalytická aktivita zvyšuje v pořadí iontu železa hemu v redukované formě $[Fe(II)]$ a iontu železa hemu v redukované formě s navázaným CO $[Fe(II)-CO] \ll$ iontu železa hemu v redukované formě s navázaným O_2 $[Fe(II)-O_2] <$ iontu železa hemu v oxidované formě $[Fe(III)]$ [48,55,58]. Protein *EcDOS* je tedy enzymově podobně aktivní v oxidovaném i redukovaném stavu iontu železa hemu, na rozdíl od YddV, kde oxidovaná forma iontu železa je asociovaná s maximální enzymovou aktivitou a při redukci dojde k zablokování aktivity.

Poté byl také zkoumán vliv inhibitorů, Artesunate a MSU-39446 (HC106), na enzymovou aktivitu proteinu *EcDOS*. Tyto látky inhibují DosS a DosT [32,59]. *EcDOS* obsahuje PAS sensorovou doménu a funkční doména vykazuje fosfodiesterasovou aktivitu, kdežto DosS a DosT mají GAF sensorovou doménu s kinasovou aktivitou funkční domény [5]. Bylo zjištěno, že ani Artesunate ani MSU-39446 (HC106) nemají vliv na enzymovou aktivitu *EcDOS* při námi zvolených podmínkách. Je tedy pravděpodobné, že testované látky nejsou inhibitory *EcDOS*. Nicméně pro detailní analýzu bude potřeba experimenty zopakovat za jiných podmínek, tj. kratší čas inkubace apod. Tímto přístupem bude možno ověřit, zda testované látky nemají alespoň slabý inhibiční efekt na *EcDOS*. Dále bude potřeba vyzkoušet efekt

testovaných látek na zástupci hemových sensorových proteinů s globinovou strukturou sensorové domény (např. AfGcHK). Bude zajímavé zjistit, zda pro inhibiční efekt daných látek je podstatná přítomnost GAF domény, nebo budou schopny inhibovat i proteiny s jinou než touto strukturou sensorové domény.

Všechny cíle bakalářské práce byly splněny. Podařilo se exprimovat a izolovat protein *EcDOS*. Dále byla prokázána jeho enzymová aktivita poté, co byl inkubován se substrátem. Nebyl pozorován inhibiční vliv Artesunate a MSU-39446 (HC106). Prozatím je známo, že tyto inhibitory mají vliv na enzymovou aktivitu proteinů s GAF sensorovou doménou. Naším úkolem bylo testovat jejich vliv na proteiny s PAS sensorovou doménou. Ráda bych pokračovala ve studiu vlivu inhibitorů a analyzovala ještě další podmínky, které na inhibici fosfodiesterasové aktivity *EcDOS* mohou mít vliv.

6 Závěr

Tato bakalářská práce se zaměřila na studium hemových sensorových proteinů, konkrétně na modelový hemový sensorový protein, který detekuje kyslík s označením *EcDOS*. Všechny stanovené cíle předkládané bakalářské práce byly splněny, konkrétně bylo dosaženo níže uvedených výsledků:

1. Rešerše aktuálních výsledků vědeckých prací, které se týkají dané problematiky, je uvedena na str. 11 až 26.
2. Protein *EcDOS* byl úspěšně exprimován v buňkách *E. coli* BL-21 (DE3) po indukci IPTG. Z celkového objemu 1 litru TB média bylo vyprodukováno 7,0 g buněk *E. coli* BL-21 (DE3), které obsahovaly daný protein.
3. Exprese proteinu *EcDOS* v buňkách *E. coli* BL-21 (DE3) proběhla úspěšně. Celkový výtěžek izolace byl 0,8 mg proteinů *EcDOS* tj. výtěžek 0,11 mg/g buněk *E. coli* BL-21 (DE3) a 0,8 mg/l TB media.
4. Připravený preparát proteinu *EcDOS* byl plně enzymově aktivní za všech testovaných podmínek (tj. jak v oxidované formě iontu železa hemu, tak v případě jeho redukce).
5. Potenciální inhibitory hemových sensorových proteinů, Artesunate a MSU-39446 (HC106), neměly za zvolených podmínek na enzymovou aktivitu *EcDOS* žádný vliv.

Seznam použité literatury

- [1] Murray, R.K. *Harperova biochemie*; H & H: Praha, **2002**.
- [2] Job, P.; Šípál, Z.; Heřmánek, M. *Biochemie: celost. vysokošk. učebnice pro stud. pedag. a přírodovědeckých fakult*; SPN: Praha, **1992**.
- [3] Poulos, T.L. Heme Enzyme Structure and Function. *Chem. Rev.*, **2014**, *114*, 3919–3962.
- [4] Igarashi, J.; Kitanishi, K.; Shimizu, T. 73 Emerging Roles of Heme as a Signal and a Gas-Sensing Site: Heme-Sensing and Gas-Sensing Proteins. In *Handbook of Porphyrin Science*; Handbook of Porphyrin Science; World Scientific Publishing Company, **2011**; Vol. Volume 15, pp. 399–460.
- [5] Shimizu, T.; Huang, D.; Yan, F.; Stranova, M.; Bartosova, M.; Fojtíková, V.; Martínková, M. Gaseous O₂, NO, and CO in Signal Transduction: Structure and Function Relationships of Heme-Based Gas Sensors and Heme-Redox Sensors. *Chem. Rev.*, **2015**, *115*, 6491–6533.
- [6] Shimizu, T.; Lengalova, A.; Martínek, V.; Martínková, M. Heme: Emergent Roles of Heme in Signal Transduction, Functional Regulation and as Catalytic Centres. *Chem Soc Rev*, **2019**, *48*, 5624–5657.
- [7] Igarashi, J.; Kitanishi, K.; Martinkova, M.; Murase, M.; Iizuka, A.; Shimizu, T. The Roles of Thiolate-Heme Proteins, Other Than the P450 Cytochromes, in the Regulation of Heme-Sensor Proteins. *Acta Chim. Slov.*, **2008**, *9*.
- [8] Zhang, L.; Guarente, L. Heme Binds to a Short Sequence That Serves a Regulatory Function in Diverse Proteins. *The EMBO Journal*, **1995**, *14*, 313–320.
- [9] Igarashi, J.; Murase, M.; Iizuka, A.; Pichierri, F.; Martinkova, M.; Shimizu, T. Elucidation of the Heme Binding Site of Heme-Regulated Eukaryotic Initiation Factor 2 α Kinase and the Role of the Regulatory Motif in Heme Sensing by Spectroscopic and Catalytic Studies of Mutant Proteins. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 18782–18791.
- [10] Yang, J.; Ishimori, K.; O'Brian, M.R. Two Heme Binding Sites Are Involved in the Regulated Degradation of the Bacterial Iron Response Regulator (Irr) Protein. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 7671–7676.
- [11] Chen, J.-J. Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2 α kinase: relevance to anemias. *Blood*, **2007**, *109*, 2693–2699.
- [12] Taketani, S. Aquisition, Mobilization and Utilization of Cellular Iron and Heme: Endless Findings and Growing Evidence of Tight Regulation. *Tohoku J. Exp. Med.*, **2005**, *205*, 297–318.
- [13] Igarashi, K.; Sun, J. The Heme-Bach1 Pathway in the Regulation of Oxidative Stress Response and Erythroid Differentiation. *Antioxid. Redox Signal.*, **2006**, *8*, 107–118.
- [14] Chen, J.-J. Translational Control by Heme-Regulated EIF2 α Kinase during Erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*, **2014**, *21*, 172–178.
- [15] Joncas, F.-H.; Adjibade, P.; Mazroui, R. Rôle de l'hème regulated inhibitor (HRI) dans la résistance à l'apoptose. *Med Sci (Paris)*, **2014**, *30*, 882–888.
- [16] Bauer, B.N.; Rafie-Kolpin, M.; Lu, L.; Han, A.; Chen, J.J. Multiple

- Autophosphorylation Is Essential for the Formation of the Active and Stable Homodimer of Heme-Regulated EIF2alpha Kinase. *Biochemistry*, **2001**, *40*, 11543–11551.
- [17] Rafie-Kolpin, M.; Han, A.-P.; Chen, J.-J. Autophosphorylation of Threonine 485 in the Activation Loop Is Essential for Attaining EIF2alpha Kinase Activity of HRI. *Biochemistry*, **2003**, *42*, 6536–6544.
- [18] Farhana, A.; Saini, V.; Kumar, A.; Lancaster, J.R.; Steyn, A.J.C. Environmental Heme-Based Sensor Proteins: Implications for Understanding Bacterial Pathogenesis. *Antioxid Redox Signal*, **2012**, *17*, 1232–1245.
- [19] Jain, R.; Chan, M.K. Mechanisms of Ligand Discrimination by Heme Proteins. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2003**, *8*, 1–11.
- [20] Henry, J.T.; Crosson, S. Ligand-Binding PAS Domains in a Genomic, Cellular, and Structural Context. *Annual Review of Microbiology*, **2011**, *65*, 261–286.
- [21] Gilles-Gonzalez, M.A.; Gonzalez, G. Regulation of the Kinase Activity of Heme Protein FixL from the Two-Component System FixL/FixJ of *Rhizobium Meliloti*. *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 16293–16297.
- [22] Tuckerman, J.R.; Gonzalez, G.; Sousa, E.H.S.; Wan, X.; Saito, J.A.; Alam, M.; Gilles-Gonzalez, M.-A. An Oxygen-Sensing Diguanylate Cyclase and Phosphodiesterase Couple for c-Di-GMP Control. *Biochemistry*, **2009**, *48*, 9764–9774.
- [23] Hengge, R. Principles of C-Di-GMP Signalling in Bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2009**, *7*, 263–273.
- [24] Schirmer, T.; Jenal, U. Structural and Mechanistic Determinants of C-Di-GMP Signalling. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2009**, *7*, 724–735.
- [25] Aono, S. Novel Bacterial Gas Sensor Proteins with Transition Metal-Containing Prosthetic Groups as Active Sites. *Antioxid. Redox Signal.*, **2012**, *16*, 678–686.
- [26] Yan, F.; Fojtikova, V.; Man, P.; Stranova, M.; Martínková, M.; Du, Y.; Huang, D.; Shimizu, T. Catalytic Enhancement of the Heme-Based Oxygen-Sensing Phosphodiesterase EcDOS by Hydrogen Sulfide Is Caused by Changes in Heme Coordination Structure. *Biometals*, **2015**, *28*, 637–652.
- [27] Ishitsuka, Y.; Araki, Y.; Tanaka, A.; Igarashi, J.; Ito, O.; Shimizu, T. Arg97 at the Heme-Distal Side of the Isolated Heme-Bound PAS Domain of a Heme-Based Oxygen Sensor from *Escherichia Coli* (Ec DOS) Plays Critical Roles in Autoxidation and Binding to Gases, Particularly O₂. *Biochemistry*, **2008**, *47*, 8874–8884.
- [28] Shimizu, T. The Heme-Based Oxygen-Sensor Phosphodiesterase Ec DOS (DosP): Structure-Function Relationships. *Biosensors*, **2013**, *3*, 211–237.
- [29] Voet, D.; Kotyk, A.; Geis, I.; Pecák, M.; Voet, J.G. *Biochemie*; Victoria Publishing: Praha, **1995**.
- [30] Aravind, L.; Ponting, C.P. The GAF Domain: An Evolutionary Link between Diverse Phototransducing Proteins. *Trends Biochem. Sci.*, **1997**, *22*, 458–459.
- [31] Saini, D.K.; Malhotra, V.; Dey, D.; Pant, N.; Das, T.K.; Tyagi, J.S. DevR-DevS Is a Bona Fide Two-Component System of *Mycobacterium Tuberculosis* That Is Hypoxia-Responsive in the Absence of the DNA-Binding Domain of DevR. *Microbiology*

- (*Reading, Engl.*), **2004**, *150*, 865–875.
- [32] Zheng, H.; Colvin, C.J.; Johnson, B.K.; Kirchoff, P.D.; Wilson, M.; Jorgensen-Muga, K.; Larsen, S.D.; Abramovitch, R.B. Inhibitors of Mycobacterium Tuberculosis DosRST Signaling and Persistence. *Nat. Chem. Biol.*, **2017**, *13*, 218–225.
- [33] Freitas, T.A.K.; Saito, J.A.; Hou, S.; Alam, M. Globin-Coupled Sensors, Protoglobins, and the Last Universal Common Ancestor. *J. Inorg. Biochem.*, **2005**, *99*, 23–33.
- [34] Martínková, M.; Kitanishi, K.; Shimizu, T. Heme-Based Globin-Coupled Oxygen Sensors: Linking Oxygen Binding to Functional Regulation of Diguanylate Cyclase, Histidine Kinase, and Methyl-Accepting Chemotaxis. *J. Biol. Chem.*, **2013**, *288*, 27702–27711.
- [35] Donné, J.; Van Kerckhoven, M.; Maes, L.; Cos, P.; Dewilde, S. The Role of the Globin-Coupled Sensor YddV in a Mature E. Coli Biofilm Population. *Biochim. Biophys. Acta*, **2016**, *1864*, 835–839.
- [36] Marletta, M.A. Nitric Oxide Synthase: Aspects Concerning Structure and Catalysis. *Cell*, **1994**, *78*, 927–930.
- [37] Hill, B.G.; Dranka, B.P.; Bailey, S.M.; Lancaster, J.R.; Darley-Usmar, V.M. What Part of NO Don't You Understand? Some Answers to the Cardinal Questions in Nitric Oxide Biology. *J. Biol. Chem.*, **2010**, *285*, 19699–19704.
- [38] de Mel, A.; Murad, F.; Seifalian, A.M. Nitric Oxide: A Guardian for Vascular Grafts? *Chem. Rev.*, **2011**, *111*, 5742–5767.
- [39] Arnold, W.P.; Mittal, C.K.; Katsuki, S.; Murad, F. Nitric Oxide Activates Guanylate Cyclase and Increases Guanosine 3':5'-Cyclic Monophosphate Levels in Various Tissue Preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1977**, *74*, 3203–3207.
- [40] Fritz, B.G.; Roberts, S.A.; Ahmed, A.; Breci, L.; Li, W.; Weichsel, A.; Brailey, J.L.; Wysocki, V.H.; Tama, F.; Montfort, W.R. Molecular Model of a Soluble Guanylyl Cyclase Fragment Determined by Small-Angle X-Ray Scattering and Chemical Cross-Linking. *Biochemistry*, **2013**, *52*, 1568–1582.
- [41] Lee, Y.-C.; Martin, E.; Murad, F. Human Recombinant Soluble Guanylyl Cyclase: Expression, Purification, and Regulation. *PNAS*, **2000**, *97*, 10763–10768.
- [42] Zhao, Y.; Hoganson, C.; Babcock, G.T.; Marletta, M.A. Structural Changes in the Heme Proximal Pocket Induced by Nitric Oxide Binding to Soluble Guanylate Cyclase. *Biochemistry*, **1998**, *37*, 12458–12464.
- [43] Oelgeschläger, E.; Rother, M. Carbon Monoxide-Dependent Energy Metabolism in Anaerobic Bacteria and Archaea. *Arch. Microbiol.*, **2008**, *190*, 257–269.
- [44] Gullotta, F.; Masi, A. di; Coletta, M.; Ascenzi, P. CO Metabolism, Sensing, and Signaling. *BioFactors*, **2012**, *38*, 1–13.
- [45] Roberts, G.P.; Youn, H.; Kerby, R.L. CO-Sensing Mechanisms. *Microbiol Mol Biol Rev*, **2004**, *68*, 453–473.
- [46] Kerby, R.L.; Youn, H.; Roberts, G.P. RcoM: A New Single-Component Transcriptional Regulator of CO Metabolism in Bacteria. *J. Bacteriol.*, **2008**, *190*, 3336–3343.
- [47] Miksanova, M.; Igarashi, J.; Minami, M.; Sagami, I.; Yamauchi, S.; Kurokawa, H.; Shimizu, T. Characterization of Heme-Regulated EIF2alpha Kinase: Roles of the N-

- Terminal Domain in the Oligomeric State, Heme Binding, Catalysis, and Inhibition. *Biochemistry*, **2006**, *45*, 9894–9905.
- [48] Lengalova, A.; Fojtikova-Proskova, V.; Vavra, J.; Martínek, V.; Stranava, M.; Shimizu, T.; Martinkova, M. Kinetic Analysis of a Globin-Coupled Diguanylate Cyclase, YddV: Effects of Heme Iron Redox State, Axial Ligands, and Heme Distal Mutations on Catalysis. *J. Inorg. Biochem.*, **2019**, *201*, 110833.
- [49] Stranava, M.; Man, P.; Skálová, T.; Kolenko, P.; Blaha, J.; Fojtikova, V.; Martínek, V.; Dohnálek, J.; Lengalova, A.; Rosůlek, M.; Shimizu, T.; Martínková, M. Coordination and Redox State-Dependent Structural Changes of the Heme-Based Oxygen Sensor AfGcHK Associated with Intraprotein Signal Transduction. *J. Biol. Chem.*, **2017**, *292*, 20921–20935.
- [50] Fojtíková, V. Důležité Role Hemu: Signál pro Hem-Detekující Proteiny a Detekční Místo v Plyn-Detekujících Proteinech. Bakalářská práce, Univerzita Karlova: Praha, **2012**.
- [51] Křížová, V. Příprava a Charakterizace Bakteriálního Proteinu YddV (Globin Obsajující Kyslíkový Senzor s Diguanylát Cyklasovou Aktivitou). Bakalářská práce, Univerzita Karlova: Praha, **2012**.
- [52] Fojtík, L. Charakterizace Vybraných Vlastností Modelových Zástupců Hemových Sensorových Proteinů. Bakalářská práce, Univerzita Karlova: Praha, **2018**.
- [53] Hengen, P. Purification of His-Tag Fusion Proteins from Escherichia Coli. *Trends Biochem. Sci.*, **1995**, *20*, 285–286.
- [54] Yoshimura, T.; Sagami, I.; Sasakura, Y.; Shimizu, T. Relationships between Heme Incorporation, Tetramer Formation, and Catalysis of a Heme-Regulated Phosphodiesterase from Escherichia Coli A STUDY OF DELETION AND SITE-DIRECTED MUTANTS. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 53105–53111.
- [55] Tanaka, A.; Takahashi, H.; Shimizu, T. Critical Role of the Heme Axial Ligand, Met95, in Locking Catalysis of the Phosphodiesterase from Escherichia Coli (Ec DOS) toward Cyclic DiGMP. *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282*, 21301–21307.
- [56] Anzenbacher, P.; Marchal, S.; Palacký, J.; Anzenbacherová, E.; Domaschke, T.; Lange, R.; Shimizu, T.; Kitanishi, K.; Stranava, M.; Stiborová, M.; Martinkova, M. Pressure Effects Reveal That Changes in the Redox States of the Heme Iron Complexes in the Sensor Domains of Two Heme-Based Oxygen Sensor Proteins, EcDOS and YddV, Have Profound Effects on Their Flexibility. *FEBS J.*, **2014**, *281*, 5208–5219.
- [57] Itoh, T.; Matsuura, S.-I.; Chuong, T.T.; Tanaike, O.; Hamakawa, S.; Shimizu, T. Successful Mesoporous Silica Encapsulation of Optimally Functional EcDOS (E. Coli Direct Oxygen Sensor), a Heme-Based O₂-Sensing Phosphodiesterase. *Anal Sci*, **2019**, *35*, 329–335.
- [58] Tanaka, A.; Shimizu, T. Ligand Binding to the Fe(III)-Protoporphyrin IX Complex of Phosphodiesterase from Escherichia Coli (Ec DOS) Markedly Enhances Catalysis of Cyclic Di-GMP: Roles of Met95, Arg97, and Phe113 of the Putative Heme Distal Side in Catalytic Regulation and Ligand Binding. *Biochemistry*, **2008**, *47*, 13438–13446.
- [59] Zheng, H.; Williams, J.T.; Aleiwi, B.; Ellsworth, E.; Abramovitch, R.B. Inhibiting Mycobacterium Tuberculosis DosRST Signaling by Targeting Response Regulator DNA Binding and Sensor Kinase Heme. *ACS Chem. Biol.*, **2020**, *15*, 52–62.