

Opravný list k bakalářské práci

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Lukrécie Sophie Vojáčková

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

Praha 2020

Na straně 39 je tabulka č. 1 nahrazena touto tabulkou:

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

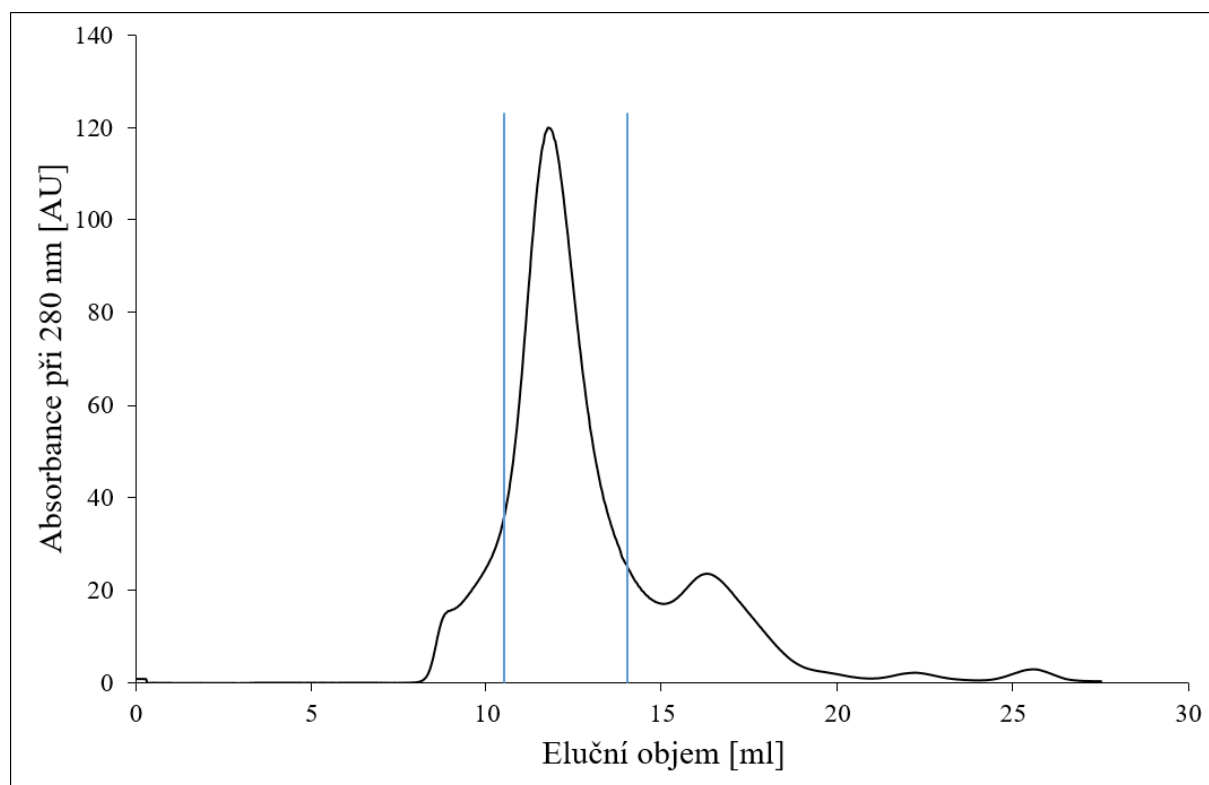
Typ vzorku	Ředění	Objem odebraného vzorku [μl]	Objem deonizované vody [μl]	Objem vzorkového pufru [μl]	Odebraný objem [μl]	Hmotnost proteinu v jamce [μg]
Buňky <i>E. coli</i> před indukcí IPTG	8×	10	20	50	10	neurčeno
Buňky <i>E. coli</i> po indukcí IPTG	8×	10	20	50	10	neurčeno
Cytosolární frakce buněk <i>E. coli</i>	4×	10	20	10	10	neurčeno
Protein <i>EcDOS</i> po afinitní chromatografii	1,3×	30	0	10	10	neurčeno
Finální preparát proteinu <i>EcDOS</i>	20×	0,2	2,7	1,1	2	0,34
	8×	1	4,3	2,7	5	2,13
	4×	3	5	4	10	8,5

Na straně 45 je popis obrázku č. 11 nahrazen tímto popisem:

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

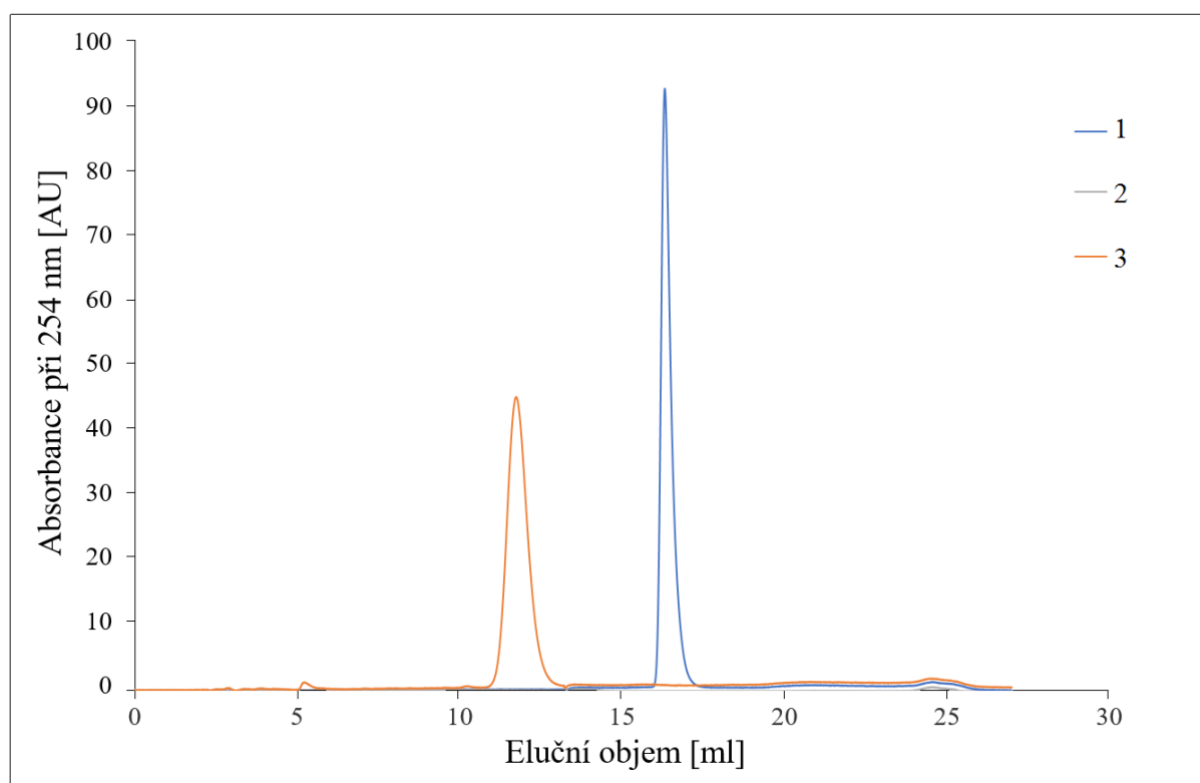
- 1: Standard Precision Plus Protein™ Standards, 10 μ l
- 2: Buňky *E. coli* před indukcí exprese proteinu pomocí IPTG, 8 \times ředěno, 10 μ l
- 3: Buňky *E. coli* po indukcii exprese proteinu pomocí IPTG, 8 \times ředěno, 10 μ l
- 4: Cytosolární frakce buněk *E. coli*, 4 \times ředěno, 10 μ l
- 5: Protein *EcDOS* po afinitní chromatografii, 1,3 \times ředěno, 10 μ l
- 6: Finální preparát proteinu *EcDOS*, 8 \times ředěno, 2,13 μ g, 5 μ l
- 7: Finální preparát proteinu *EcDOS*, 4 \times ředěno, 8,5 μ g, 10 μ l
- 8: Finální preparát proteinu *EcDOS*, 20 \times ředěno, 0,34 μ g, 2 μ l

Na straně 47 je obrázek č. 12 nahrazen takto:



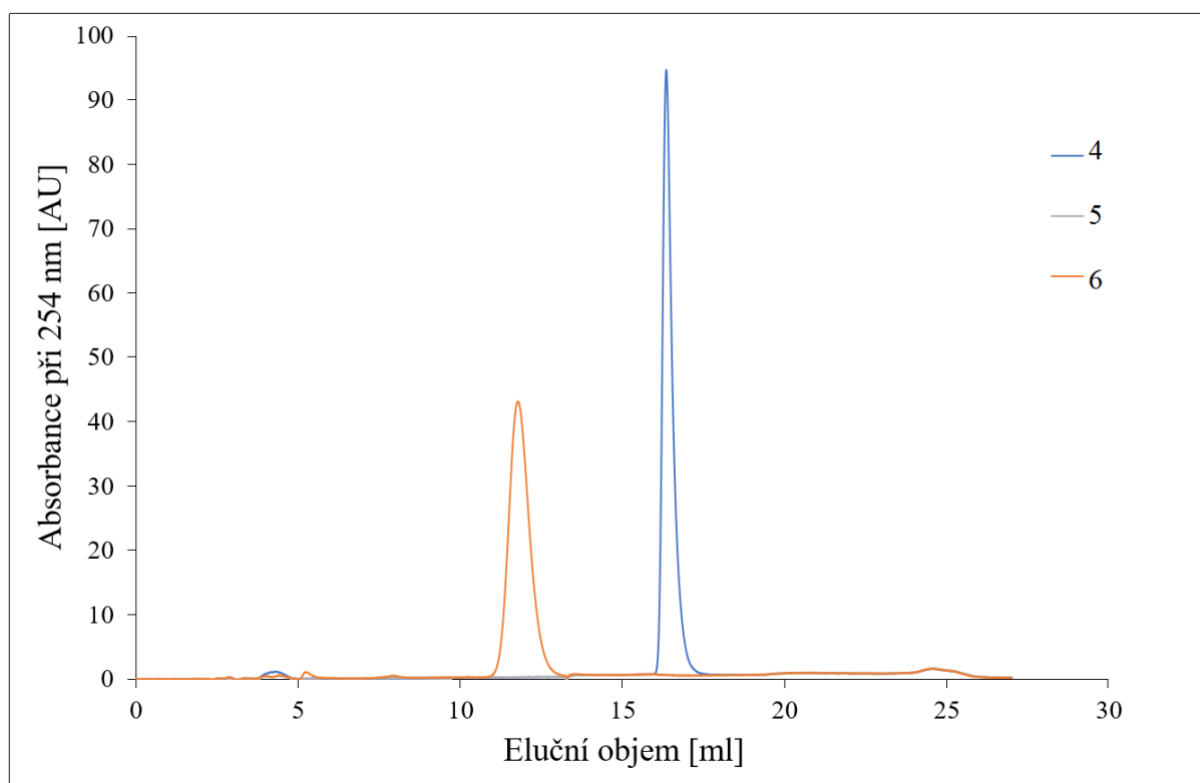
Obrázek č. 2: Chromatogram preparátu obsahujícího protein *EcDOS* analyzovaný pomocí metody gelové chromatografie. Byla měřena absorbance při 280 nm pomocí spektrofotometru a byly jímány frakce, které obsahovaly finální preparát proteinu *EcDOS* v intervalu elučních objemů 10,5 až 14 ml (znázorněn modrými čarami). Detailní podmínky analýzy vizte kapitola 3.3.4.

Na straně 48 je obrázek č. 13 nahrazen takto:



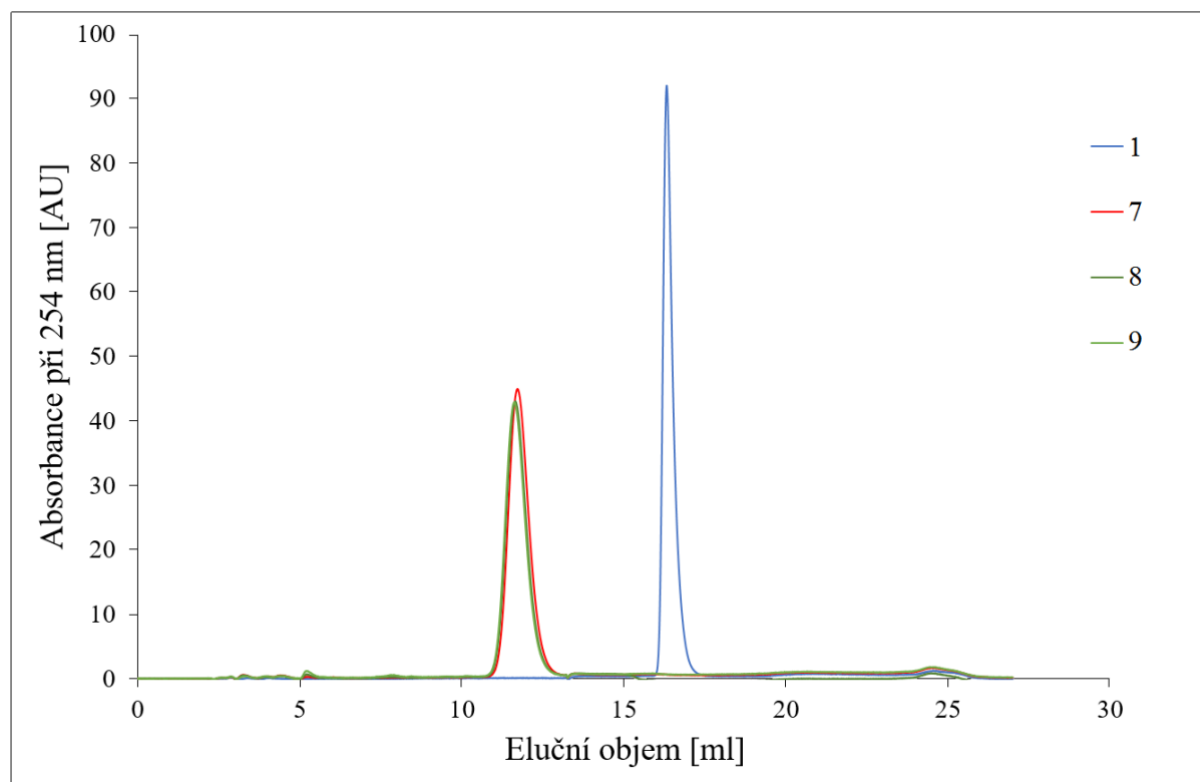
Obrázek č. 3: HPLC analýza inkubačních směsí proteinu *EcDOS* s iontem železa hemu v oxidovaném stavu [Fe(III)] za účelem stanovení jeho enzymové aktivity. Modrá křivka 1 znázorňuje analýzu c-di-GMP z kontrolní reakce, která obsahovala pouze substrát bez enzymu. Šedivá křivka 2 představuje kontrolní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

Na straně 49 je obrázek č. 14 nahrazen takto:



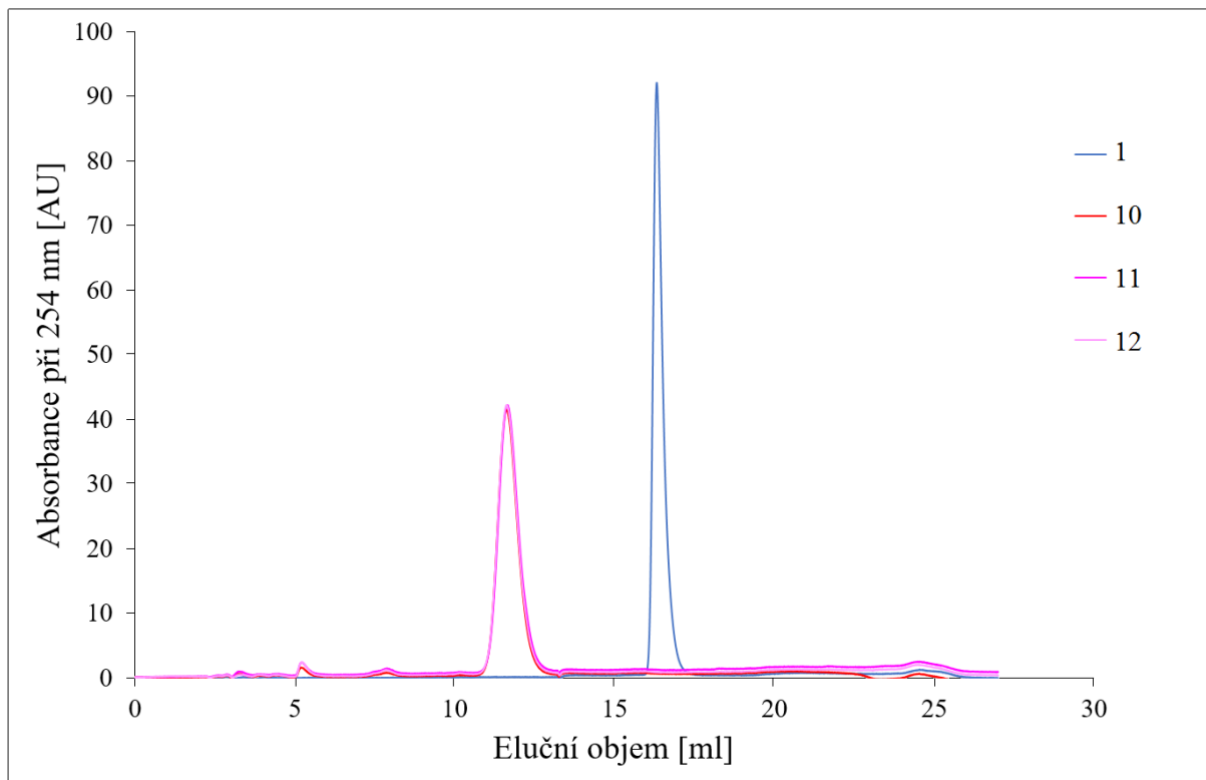
Obrázek č. 4: HPLC analýza inkubačních směsí proteinu *EcDOS* s iontem železa hemu v redukovaném stavu [Fe(II)] za účelem stanovení jeho enzymové aktivity. Modrá křivka 4 znázorňuje c-di-GMP z kontrolní reakci, která obsahovala pouze substrát bez enzymu. Šedivá křivka 5 představuje kontrolní reakci,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

Na straně 50 je obrázek č. 15 nahrazen takto:



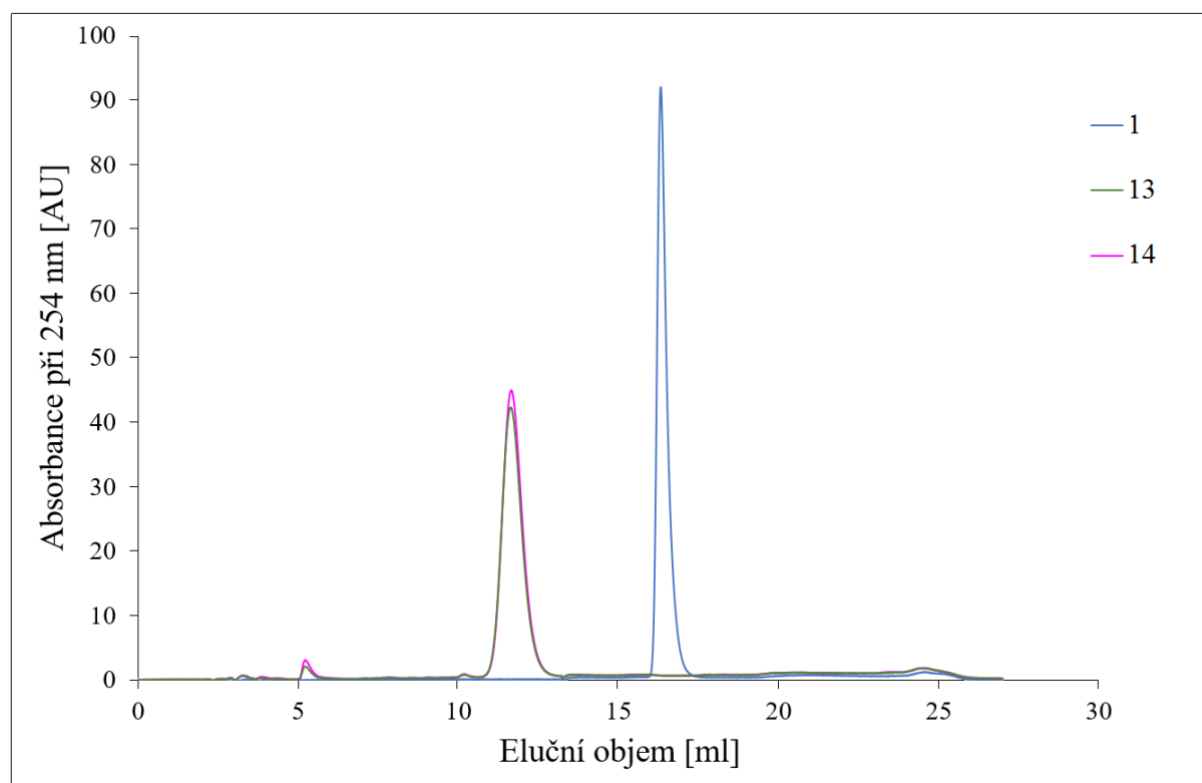
Obrázek č. 5: HPLC analýza inkubačních směsí proteinu *EcDOS* v jeho redukované formě za účelem testování vlivu potenciálního inhibitoru Artesunate na enzymovou aktivitu *EcDOS*. Modrá křivka 1 představuje analýzu c-di-GMP z kontrolní reakce. Červená křivka 7 znázorňuje kontrolní reakci obsahující *EcDOS* s iontem železa hemu v redukovaném stavu [Fe(II)], substrát reakce c-di-GMP a rozpouštědlo DMSO. Tmavě zelená křivka 8 představuje *EcDOS* s iontem železa hemu v redukovaném 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 .

Na straně 51 je obrázek č. 16 nahrazen takto:



Obrázek č. 6: 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 redukovaném stavu [Fe(II)], substrát reakce c-di-GMP a rozpouštědlo DMSO. Tmavě růžová křivka 11 představuje *EcDOS* s iontem železa hemu v redukovaném 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 .

Na straně 52 je obrázek č. 17 nahrazen takto:



Obrázek č. 7: 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 μM . 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 μM .

Na straně 61 je citace [1] doplněna o stránkový rozsah následovně:

[1] Murray, R.K. *Harperova biochemie*; H & H: Praha, **2002**, 354–368.

Na straně 63 je citace [41] upravena následovně:

[41] Lee, Y.-C.; Martin, E.; Murad, F. Human Recombinant Soluble Guanylyl Cyclase: Expression, Purification, and Regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2000**, *97*, 10763–10768.

Na straně 64 je citace [50] upravena následovně:

[50] Fojtíková, V. Důležité role hemu: signál pro hem-detekující proteiny a detekční místo v plyn-detekujících proteinech. Bakalářská práce, Univerzita Karlova: Praha, **2012**.

Na straně 64 je citace [51] upravena následovně:

[51] Křížová, V. Příprava a charakterizace bakteriálního proteinu YddV (globin obsahující kyslíkový senzor s diguanylát cyklosovou aktivitou). Bakalářská práce, Univerzita Karlova: Praha, **2012**.

Na straně 64 je citace [52] upravena následovně:

[52] Fojtík, L. Charakterizace vybraných vlastností modelových zástupců hemových senzorových proteinů. Bakalářská práce, Univerzita Karlova: Praha, **2018**.