

## Abstrakt

Protein FrpC je produkovaný bakterií *Neisseria meningitidis* v lidském hostiteli. Tento protein je charakteristický přítomností RTX domény, která jej řadí do stejnojmenné rodiny bakteriálních toxinů. Protein FrpC vykazuje unikátní autokatalytickou štěpící aktivitu, kterou zajišťuje 177 aminokyselin dlouhá část (SPM, Self-Processing Module). Bez navázaného  $\text{Ca}^{2+}$  zaujímá SPM neuspořádanou strukturu. Po vazbě iontu se protein sbalí a je schopen vykonat enzymatickou aktivitu. Analýza struktury sbaleného SPM by mohla odhalit funkční souvislosti vazby iontu a autokatalytického sestřihu. Bohužel řešení struktury SPM pomocí NMR se ukázalo být velmi obtížné kvůli dlouhé nestrukturované části sekvence uvnitř SPM.

Předmětem této práce se tedy stal popis SPM pomocí fluorescenčních metod, charakterizace vazby iontu do SPM, tak i strukturních změn, které se v průběhu vazby  $\text{Ca}^{2+}$  odehrávají. Byla stanovena disociační konstanta vazby kovového iontu do SPM,  $k_D \sim 17 \mu\text{M}$ , která se nachází v koncentračním rozmezí  $\text{Ca}^{2+}$ , kdy dochází ke sbalování SPM proteinu ( $1\text{-}20 \mu\text{M}$ ). Součástí pochopení struktury SPM bylo zjištění, že obě tryptofanová rezidua Trp<sub>451</sub> a Trp<sub>519</sub> v SPM interagují jak s navázanými ionty, tak spolu navzájem. Pro tento účel byly použity plně funkční varianty SPM s jedním tryptofanem, W451F a W519F, a luminiscenční analog vápníku, terbium ( $\text{Tb}^{3+}$ ). Měřením rezonančního přenosu energie (FRET) z Trp na  $\text{Tb}^{3+}$  byla určena vzdálenost 6 Å, která ve sbaleném SPM proteinu dělí Trp<sub>451</sub> a navázaný iont  $\text{Tb}^{3+}$ . Součástí této práce je také metodický náhled do vlastností  $\text{Tb}^{3+}$ , jehož absorpční vlastnosti jsou proměnné podle toho, je-li navázáno v hydrofobním vazebném místě, či volně v roztoku. Pochopení vlivu elektrostatické interakce mezi dvěma tryptofany na terciární strukturu proteinů pomocí geometrických analýz dostupných konfigurací Trp-Trp z proteinových struktur z PDB databáze umožnilo odůvodněně navrhnout konfiguraci Trp-Trp v rámci SPM.

**Klíčová slova:** auto-katalytické štěpení, RTX proteiny, FrpC protein, vazebné místo pro vápník, vápník, terbium, *Neisseria meningitidis*