

## Abstrakt

V živých organismech probíhá každým okamžikem nespočet dějů s účastí přenosu/transportu elektronu (ET). Proto jejich studium je důležitým cílem moderní strukturně-funkční proteomiky. Pro řadu experimentů byl a je používán modelový protein azurin z *P. aeruginosa*. Tento modrý protein obsahující centrální atom mědi má charakteristické absorpční maximum při 630 nm v redoxním stavu Cu(II). Během jeho oxidace na Cu(I) dochází k poklesu hodnoty absorbance při 630 nm ( $A_{630}$ ) a tak lze UV-Vis spektra použít pro sledování průběhu jeho ET reakcí.

Naším cílem bylo vložit světlem aktivovatelný strukturní analog kanonické aminokyseliny Met – L-2-amino-5,5-azihexanovou kyselinu (foto-Met) – do sekvence azurinu a využít vzniklý proteinový produkt pro studium oligomerizace azurinu v roztoku pomocí techniky světlem iniciovaného síťování (PIXL). Použitím optimalizovaných protokolů pro rekombinantní expresi v *E. coli* B834 jsme vložili foto-Met do přirozeného azurinu a konstruktů Az2W, ve kterém jsou přítomny dva blízké Trp, u kterých byla potvrzena role při elektronovém přeskoku („hopping“) napříč protein-proteinovým rozhraním. Míra inkorporace foto-Met do sekvence proteinů byla určena pomocí MALDI-TOF MS po separaci proteinů na SDS-PAGE a štěpení proteasou v gelu. Pomocí metody PIXL byl studován vliv rostoucí celkové koncentrace proteinu (v rozsahu koncentrací 15–300  $\mu$ M) na míru interakce azurin-azurin. Vzorky byly po jednodominutovém ozáření intenzivním UV světlem analyzovány a vyhodnoceny pomocí UV-Vis spektroskopie a SDS-PAGE, která prokázala tvorbu proteinového proužku o relativní mobilitě 28–30 kDa. Tento nový produkt odpovídá molekulové hmotnosti dimeru azurinu a jeho MALDI-TOF MS analýza a LC-MS/MS analýzy prokázaly, že se jedná o produkt azurinu. Současně měly posloužit k určení struktury vytvořeného zesíťení. Intenzita tvorby dimeru rostla spolu se vzrůstající koncentrací azurinu v roztoku a v případě Az2W byla intenzivnější ve srovnání s WT při nižších hodnotách koncentrací azurinu v roztoku. Současně, srovnání UV-Vis spekter před a po UV ozáření vzorků během PIXL experimentu vedlo k odhalení značného poklesu hodnoty  $A_{630}$ , který pravděpodobně naznačuje změnu redoxního stavu centrálního atomu Cu. Tento neobvyklý efekt nebyl pozorován v takové míře v kontrolním experimentu s azuriny obsahujícími Met v sekvenci.

Naše výsledky potvrzují roli dvou Trp na interakčním povrchu (je tvořen  $\beta$ -listem v blízkosti aktivního centra) nejen při intermolekulárním elektronovém přeskoku, ale i při vlastní oligomerizaci azurinu. Získané výsledky otevírají novou cestu možného metodického přístupu pro studium ET reakcí v proteinech a pro výzkumné využití foto-Met při jejich iniciaci.

Diplomová práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (GAUK č. 1538119) a Grantovou agenturou České republiky (20-28126S).

(V angličtině)