

Abstrakt

Je dobře známo, že velká rozmanitost proteinových funkcí a struktur je umožněna širokým spektrem fyzikálně-chemických vlastností 20 standardních aminokyselin, které tvoří moderní proteiny. Podle obecně přijímané koevoluční teorie genetického kódu, evoluce proteinových struktur a funkcí byla nepřetržitě spojena s rozšiřováním genetického kódu, přičemž aromatické aminokyseliny jsou považovány za nejvíce pozdní členy genetického kódu. Jejich inkorporace zřejmě přispěla ke zvýšení strukturní stability proteinů a diverzifikaci jejich katalických funkcí.

Hlavním cílem této diplomové práce bylo otestovat, zda enzymová katalýza mohla předcházet inkorporaci aromatických aminokyselin do standardního genetického kódu. Pro tento účel byl prozkoumán vliv redukce aminokyselinového repertoáru na strukturu a funkci defosfokoenzym A kinasy (DPCK). Defosfokoenzym A kinasa katalyzuje poslední krok v biosyntéze koenzymu A, což je evolučně vysoce konzervovaný kofaktor.

V této práci byly navrženy dva mutantní proteiny DPCK z termofilní bakterie, *Aquifex aeolicus*, tak, aby aromatické aminokyseliny byly nahrazeny (i) leuciny a (ii) nearomatickými aminokyselinami pro co největší zachování strukturní stability proteinu. Původní varianta (z angl. wild type) proteinu a dva mutantní proteiny postrádající aromatické aminokyseliny byly zaklonovány a úspěšně exprimovány v *Escherichia coli*. Purifikované proteiny pak byly charakterizovány z hlediska zachování sekundární a terciární struktury a enzymové aktivity v mutantech. Strukturní charakterizace ukazuje, že substituce aromatických aminokyselin nearomatickými aminokyselinami může zachovat bohatou sekundární strukturu, ale vede k výrazné ztrátě pevného globulárního uspořádání, což má za následek významné snížení nebo ztrátu enzymové aktivity. Zatímco jeden z mutantů nevykazoval žádnou námi měřitelnou katalytickou aktivitu, leucinový mutant byl na rozdíl od původní formy proteinu schopen ATP hydrolyzy (i v nepřítomnosti druhého substrátu) a měl výrazně sníženou fosfotransferasovou aktivitu.

Tato práce tedy na zvoleném příkladu proteinu DPCK ukazuje, že i při absenci aromatických aminokyselin může být protein schopen tvořit strukturní uspořádání a vykazovat enzymatickou aktivitu, i když se znatelně sníženou účinností.

Klíčová slova: proteinová reverzní evoluce, koenzym A, defosfokoenzym A kinasa, CD spektroskopie, omezená proteolýza.