

Abstrakt

K pochopení funkce proteinu významně přispívá znalost jeho trojrozměrné struktury, obzvláště v případě komplexů s ligandy. Metody strukturní biologie, jako je rentgenová krystalografie, SAXS nebo NMR, jsou proto ve strukturní analýze interakcí proteinů s ligandy široce využívány. V této práci byly tyto metody využity k objasnění molekulární podstaty dvou biologických dějů využívajících proteinové interakce: rentgenostrukturní analýza byla použita ke studiu vazby efektorové molekuly k prokaryotnímu transkripčnímu faktoru, metody NMR a SAXS byly využity ke studiu interakce monoklonální protilátky s proteinovým antigenem.

Transkripční regulátor DeoR negativně reguluje expresi katabolických genů pro využití deoxyribonukleosidů a deoxyribosy v bakterii *Bacillus subtilis*. DeoR se skládá z N-koncové DNA-vazebné domény a z C-koncové efektor-vazebné domény (C-DeoR). Jeho funkce je regulována vazbou nízkomolekulárního efektoru deoxyribosa-5-fosfátu. Vyřešili jsme krystalové struktury C-DeoR ve volné formě a v komplexu s deoxyribosa-5-fosfátem. Strukturní analýza odhalila unikátní vazbu mezi molekulou efektoru a lysylovým zbytkem efektor-vazebného místa prostřednictvím reversibilní dvojné vazby typu Schiffovy base. Fysiologická relevance této vazby byla potvrzena mutačními experimenty a také analýzou tvorby kovalentních aduktů v roztoku pomocí hmotnostní spektrometrie. Porovnání struktur volné C-DeoR a komplexu C-DeoR s efektořem vysvětlilo na molekulární úrovni funkci DeoR jako molekulárního spínače.

CD44, buněčný receptor pro hyaluronát, se účastní buněčné adheze, migrace a metastazování nádorů. CD44 váže hyaluronát prostřednictvím hyaluronát-vazebné domény (HABD), což indukuje v HABD rozsáhlou konformační změnu, vedoucí k proteolytickému uvolnění CD44 z povrchu buněk. Vytvořili jsme jednořetězcový variabilní fragment (scFv) protilátky MEM-85. MEM-85 má terapeutický potenciál, rozpoznává nedostatečně popsany epitop v HABD, blokuje vazbu hyaluronátu a indukuje odštěpení CD44. Fragmenty scFv jsou kvůli své oligomeraci obvykle nehomogenní. Vyvinuli jsme nový optimalizační přístup, pomocí něhož jsme připravili homogenní vzorek scFv vhodný pro NMR mapování antigen-vazebného epitopu protilátky MEM-85 v CD44 HABD. Toto mapování společně s mutační analýzou vedlo k identifikaci protilátkového epitopu v C-koncové části HABD. Na základě SAXS analýzy jsme také vytvořili model komplexu HABD s scFv MEM-85. Tyto biofyzikální metody přinesly detailní vzhled do mechanismu funkce MEM-85: MEM-85 váže epitop, který se nachází mimo hyaluronát-vazebné místo, a indukuje v C-konci HABD strukturní změny, jež jsou podobné změnám vyvolaným vazbou hyaluronátu. Blokáce vazby hyaluronátu protilátkou MEM-85 proto nespočívá ve fyzické kompetici o vazebné místo, ale jde spíše o allosterický přenosový efekt.