

ABSTRAKT

Hmotnostně spektrometrické (MS) techniky si v průběhu posledních dvou desetiletí našly své trvalé místo mezi nástroji strukturní biologie. Kromě získání informace o primární sekvenci proteinů jsou stále častěji využívány i pro studium vyšší strukturní organizace bílkovin. Nedosahují sice atomárního prostorového rozlišení, jsou ale naopak prosty řady experimentálních omezení. MS strukturní techniky tak jsou schopny studovat molekuly za nativních podmínek v roztoku, jsou rychlé, mají nízkou spotřebu vzorku a jsou použitelné pro molekuly a jejich komplexy s velmi širokým rozsahem velikostí. Možná nejdůležitější je však jejich schopnost poskytnout informace o konformační dynamice proteinů, které tak mohou doplnit data získaná jinou strukturní technikou s vyšším prostorovým rozlišením v rámci integrativní strukturní biologie.

V této disertační práci byla hlavní pozornost věnována technice vodík / deuteriové výměny v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (HXMS), která je jednou z nejméně rozšířených strukturních MS metod. Rekombinantně připravená aspartátová proteasa nepenthesin-1 z láčkovek rodu *Nepenthes* byla charakterizována, imobilizována a podrobně testována s cílem rozšířit portfolio proteas dostupných pro HXMS experimenty a zvýšit prostorové rozlišení této techniky.

Po úspěšné implementaci do HXMS experimentálního protokolu byl nepenthesin-1 využit v kombinaci s rhizopuspepsinem při analyticky náročném studiu vysoce flexibilního proteinu celobiosadehydrogenasy (CDH). Tento biotechnologicky zajímavý protein byl zkoumán s cílem strukturně objasnit mechanismy regulace jeho aktivity pomocí pH a divalentních kationtů. Za tímto účelem byla metoda HXMS doplněna nativní hmotnostní spektrometrií s iontovou mobilitou a výpočetním modelováním distribuce elektrostatického náboje na povrchu proteinů.

Společně tyto strukturní MS a výpočetní techniky přinesly zajímavé poznatky o analýze transientních proteinových komplexů. Zejména ale poskytly přímý experimentální důkaz, že repulse oblastí negativního náboje v blízkosti mezidoménového rozhraní CDH je klíčovým mechanismem řídícím fungování tohoto enzymu.

Klíčová slova: Strukturní hmotnostní spektrometrie, nepenthesin-1, vodík / deuteriová výměna s MS (HXMS), nativní hmotnostní spektrometrie s iontovou mobilitou (IMMS), aspartátové proteasy, imobilizace proteinů, celobiosadehydrogenasa (CDH), elektrostatika povrchu proteinu, flavocytochrom, přímý přenos elektronů.