

Abstrakt

Transmembránové kanály a přenašeče z ClC proteinové rodiny se vyskytují napříč všemi živými organismy. Nacházejí se na cytoplasmatických a lysosomálních membránách buněk, kde se podílí na udržování homeostázy iontů. Narušení jejich funkce vede k vážným zdravotním komplikacím. Pro vývoj efektivní léčby těchto onemocnění je potřeba objasnit transportní mechanismus ClC proteinů. Antiporter ClC-*ec1* z *E.coli* je modelovým proteinem celé ClC proteinové rodiny. Tento homodimerní protein, který transportuje proton proti dvěma chloridovým iontům, má transportní dráhu v každé z podjednotek. Na základě krystalové struktury se předpokládá, že během transportu se protein střídavě otevírá na obě strany membrány. Otevření proteinu směrem ven je umožněno protonací tří glutamátů, které se nacházejí v transportní dráze a jsou pro transport iontů klíčové. Pro studium tohoto stavu byl navržen QQQ mutant, který má tyto glutamáty nahrazeny za glutaminy. Dosud se studium transportního mechanismu ClC-*ec1* opíralo převážně o studie založené na rentgenové krystalografii. Krystalografie poskytla statické obrázky, které neobsahovaly dostatečné informace o dynamice proteinu. Proto jsme pro studium transportního mechanismu ClC-*ec1* zvolili dynamickou metodu – vodík-deuteriovou výměnu spojenou s hmotnostní spektrometrií. Součástí práce byla exprese proteinů ClC-*ec1* a jeho QQQ mutantu v buňkách *E.coli*, jejich izolace pomocí detergentové solubilizace a purifikace pomocí afinitní a gelové permeační chromatografie. Dále bylo optimalizováno proteolytické štěpení proteinu, za účelem získu nejvyššího možného prostorového rozlišení a sekvenčního pokrytí. Nakonec byly provedeny samotné HDX-MS experimenty. V prvním experimentu byly porovnány konformace ClC-*ec1* a jeho QQQ mutantu v pH škále 4,4 až 7,4. Jelikož ClC-*ec1* při pH 4,4 nebyl plně protonován, další experiment byl proveden při nižším pH – 3,0. Poslední HDX-MS experiment sleduje změny konformace vlivem postupné protonace v rozsahu pH 3,0-4,5 a srovnává je s pH 6,5.

Klíčová slova: H/D výměna, hmotnostní spektrometrie, struktura proteinu, membránové proteiny, proton-chloridový antiporter