

10. Souhrn

Proteiny 14-3-3 jsou dimerní molekuly s charakteristickým tvarem a velikostí okolo 30 kDa vyskytující se ve všech eukaryotických organismech. Zastávají klíčové role v rozmanitých buněčných procesech, jako jsou signalizace, buněčné dělení, apoptóza atd. C-koncový segment lidské isoformy proteinu 14-3-3 ζ zastává důležitou autoinhibiční úlohu, kdy se v nepřítomnosti vazebného partnera váže do vazebného žlábků tohoto proteinu, a tím zároveň brání vazbě nevhodných ligandů. Struktura C-koncového segmentu nebyla dosud identifikována v žádné z publikovaných krystalových struktur. Oblast C-koncového segmentu je, na rozdíl od helikální oblasti α 1- α 9, sekvenčně vysoce variabilní. Usuzuje se, že C-koncový segment je velmi flexibilní a může zaujímat řadu různých konformací.

Kvasničné isoformy proteinů 14-3-3 Bmh1 a Bmh2 se vyznačují významně delším C-koncovým segmentem s neznámou funkcí obsahující polyglutaminové sekvence. Úloha C-koncových částí kvasničných proteinů Bmh1 a Bmh2 byla prostudována rozmanitými biofyzikálními technikami. Měření dynamického rozptylu světla, sedimentační rychlosti, časově rozlišeného dohasínání anizotropie fluorescence a gelové permeační chromatografie naznačují zdánlivou, významně větší velikost molekul proteinů Bmh1 a Bmh2 v porovnání s lidskou isoformou 14-3-3 ζ . Z tohoto důvodu je možné spekulovat, že C-koncový segment kvasničných proteinů Bmh způsobuje tvorbu vyšších oligomerů než jsou předpokládáné dimery. Na druhou stranu, metoda sedimentační rovnováhy jasně prokázala, že kvasničné proteiny 14-3-3 tvoří stabilní dimery. Tryptofanová fluorescenční měření naznačují, že vazba ligandu nepůsobí žádné dramatické konformační změny C-koncové části. Odstranění C-koncového segmentu nemělo významný vliv na vazebnou afinitu proteinů Bmh studovanou pomocí metody stacionárního měření anizotropie fluorescence.

V roce 2008 bylo zjištěno, že kvasničné proteiny Bmh1 a Bmh2 interagují s enzymem neutrální trehalasou 1 (Nth1). Nth1 je zodpovědná za degradaci neredukujícího disacharidu trehalosy na dvě molekuly glukosy. Kvasničné isoformy 14-3-3 proteinů Bmh1 a Bmh2 zvyšují prostřednictvím vazby závislé na fosforylaci aktivitu Nth1. Ke studiu interakce Nth1 s proteiny Bmh1 a Bmh2 byly použity techniky nativní gelové elektroforézy, měření enzymové kinetiky a sedimentační rychlosti. Bylo zjištěno, že kinasa PKA fosforyluje Nth1 *in vitro* na čtyřech serinových pozicích (20, 21, 60 a 83) *in vitro*, které se nacházejí na neuspořádaném N-koncovém segmentu tohoto enzymu. Výsledky sedimentační analýzy a enzymové kinetiky naznačují, že obě kvasničné isoformy proteinů 14-3-3 tvoří s Nth1 stabilní

komplexy a významně zvyšují její enzymovou aktivitu. Aktivace Nth1 zprostředkovaná vazbou 14-3-3 je v porovnání s kationty Ca^{2+} mnohem více účinná. Kinetické studie mutantních forem provedené v pokusech *in vitro* a *in vivo* jasně dokazují, že za aktivaci Nth1 pomocí proteinů Bmh jsou primárně odpovědná fosforylační místa Nth1 na pozicích Ser60 a Ser83.

Z našich výsledků vyplývá, že C-koncový segment kvasničných proteinů zaujímá nataženou konformaci, která vyvolává zdánlivě větší velikost molekuly a pravděpodobně nemá autoinhibiční funkci, jako je tomu u lidské 14-3-3 ζ isoformy. Pro aktivaci Nth1 prostřednictvím PKA a kvasničných isoform proteinů 14-3-3 jsou důležitá zejména fosforylační místa Ser60 a Ser83.