

ABSTRAKT

Chybné sbalování proteinů je považováno za hlavní patogenetický mechanismus homocystinurie z deficitu cystathionin beta-synthasy (CBS). Cílem této práce bylo studium molekulových mechanismů, které vedou k chybnému sbalování mutantních forem CBS.

V první části práce jsme studovali prostorové uspořádání normální lidské CBS. Pomocí diferenčního kovalentního značení povrchově dostupných aminokyselinových zbytků jsme identifikovali kontaktní plochu mezi katalytickým jádrem a regulační doménou v lidské CBS a následně jsme navrhli strukturní model plnodélkového enzymu. V další části práce jsme studovali evoluční divergenci proteinových struktur CBS. Provedli jsme fylogenetickou analýzu, která odhalila unikátní uspořádání pro CBS z třídy nematod; doménová architektura CBS z *Caenorhabditis elegans* byla podrobně studována experimentálně. Nakonec jsme studovali konformační vlastnosti vybraných mutantních forem lidské CBS, které měly do různé míry narušenou tvorbu tetrameru a sníženou enzymovou aktivitu. Pomocí proteolytických technik s využitím thermolysinu jsme analyzovali devět mutantních forem, které byly exprimovány v *E.coli*. Zjistili jsme, že rozbalení struktury je běžným jevem při chybném sbalování mutantních CBS. Důležitost rozbalení proteinů pro patogenesi deficitu CBS byla dále prokázána pomocí analýzy dalších devíti purifikovaných mutantních variant, které disponovaly nenarušenou tetramerní strukturou a normální enzymovou aktivitou. Tato data ukázala, že odlišná míra rozbalení proteinu je spolehlivým ukazatelem patogenity mutantních CBS a proteolýza thermolysinem za nativních podmínek může být důležitým nástrojem pro biochemické vyhodnocení patogenních variant.

Tato práce zvyšuje porozumění patogenních mechanismů deficitu CBS a poskytuje znalosti, které mohou být využity pro vývoj chaperonové terapie a následně kvalitnější péči o pacienty.