

## 9. Souhrn

Neutrální trehalasa 1 je kvasničný enzym z rodiny hydrolas, který katalyzuje štěpení trehalosy na dvě molekuly glukosy. Trehalosa je neredukující disacharid, který slouží v buňkách kvasinek jako zdroj uhlíku a také jako stresový metabolit. Buňka v teplotním či chemickém stresu nahromadí trehalosu, které je v rámci zotavení se po ukončení stresových podmínek hydrolyzována trehalasou.

Předmětem našeho výzkumu byla Nth1 ze *S. cerevisiae*. Jak bylo publikováno dříve (Panni, S., et al., 2008), Nth1 musí být fosforylována PKA a v přítomnosti kvasničné isoformy proteinu 14-3-3, aby byla aktivní. Aktivita také v menší míře vzroste v přítomnosti iontů  $\text{Ca}^{2+}$  (Franco, A., et al., 2003). Proteiny 14-3-3 jsou kyselé regulační proteiny, které se vyskytují ve všech eukaryotických organismech a účastní se řady buněčných dějů, jako je regulace buněčného cyklu, buněčný metabolismus, transkripce, apoptosa a další. Proteiny 14-3-3 mají přes 400 známých vazebných partnerů, mezi které patří transkripční faktory, signalizační molekuly, enzymy a další. Své vazebné partnery regulují skrze fosforylované vazebné motivy, a to změnou jejich konformace, odkrýváním či zakrýváním specifické sekvence či zprostředkováním protein-protein interakcí. Proteiny 14-3-3 se vyskytují v mnoha isoformách v různých organismech, v kvasinkách se nalézají dvě isoformy, Bmh1 a Bmh2 (Obsil, T., Obsilova, V., 2011).

Na detailní zkoumání aktivace Nth1 pomocí Bmh1 a Bmh2 bylo použito spektrum biochemických i biofyzikálních metod. Pomocí bodové mutagenese, měření sedimentační rychlosti na analytické ultracentrifuze a měření enzymové kinetiky bylo zjištěno, že Nth1 vytváří s Bmh stabilní komplex o stechiometrii 1:2, a dále byla určena fosforylační místa, zodpovědná za interakci s Bmh a tím i aktivaci enzymu. Jedná se o seriny Ser60 a Ser83, které se nacházejí na nestrukturovaném N-terminálním konci Nth1, což bylo potvrzeno limitovanou proteolýzou a analýzou peptidů pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

Vodíko-deuteriová výměna s hmotnostní spektrometrií a CD spektroskopie byly použity na určení konformačních změn, ke kterým dochází při vytvoření komplexu ve struktuře obou proteinů pNth1 a Bmh1. Na základě naměřených dat byl vytvořen

homologní model Nth1 a Bmh1 a pro jeho upřesnění byly použity vzdálenosti, naměřené chemickým zesíťováním s hmotnostní spektrometrií. U Bmh1 je vazbou k Nth1 ovlivněna podstatná část molekuly (nejen vazebný žlábek). U Nth1 ovlivňuje interakce s Bmh1 nejvíce oblast mezi 100-200 AK, což pravděpodobně odráží konformační změnu, při které dojde k odhalení předtím pohřbené aktivní části enzymu a jejímu zpřístupnění substrátu.

Z těchto výsledků vyplývá, že za aktivaci enzymu Nth1 pomocí Bmh jsou zodpovědné seriny na pozicích 60 a 83. Navázáním k Bmh1 u Nth1 dojde ke konformačním změnám, které způsobí odhalení aktivní oblasti enzymu a tím jeho aktivaci.