# Abstrakt

Enzym neutrální trehalasa (Nth1, EC 3.2.1.28), pocházející z kvasinek rodu *Saccharomyces cerevisiae*, pomáhá těmto organismům přežít v nepříznivých životních podmínkách. Nth1 hydrolyticky štěpí zásobní a ochranný disacharid trehalosu za vzniku dvou molekul glukosy. Aktivita enzymu Nth1 je regulována prostřednictvím fosforylace cAMP-dependentní proteinkinasou (PKA), následnou vazbou kvasničného proteinu 14-3-3 (Bmh1) a pomocí kationtů $Ca^{2+}$, které se váží na Ca-vazebnou doménu. Tato doména se nachází na N-konci Nth1 a obsahuje tzv. EF-hand motiv ($D^{114}$TDKNYQITIED$^{125}$), který je konzervovaný mezi velkým množstvím Ca-vazebných proteinů.

Hlavním cílem tohoto projektu bylo objasnění molekulární a strukturní podstaty mechanismu regulace aktivity Nth1 prostřednictvím vazby kationtů $Ca^{2+}$ a proteinu Bmh1. Dalšími cíli bylo vyřešení struktury samotné Nth1 a jejího komplexu s Bmh1. Pro výzkum úlohy kationtů $Ca^{2+}$ v regulaci aktivity Nth1 bylo připraveno dvanáct mutantních forem Nth1 s cílenými bodovými mutacemi v oblasti tzv. EF-hand motivu a jeho blízkém okolí a následně byla stanovena jejich aktivita v závislosti na přítomnosti Bmh1 a/nebo kationtů $Ca^{2+}$. Tvorba stabilních komplexů fosforylované pNth1 (včetně mutantních forem) s proteinem Bmh1 byla potvrzena pomocí nativní polyakrylamidové gelové elektroforézy a analytické ultracentrifugace. Vliv mutací na strukturu a vlastnosti Nth1 byl ověřen CD spektroskopií a diferenční skenovací fluorimetrií. Pro objasnění struktury proteinů Bmh1, Nth1 a jejich společného komplexu byla použita vodík/deuteriová (H/D) výměna a chemické zesítění spojené s hmotnostní spektrometrií a maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS). Souběžně s těmito metodami byly prováděny první krystalografické experimenty jak samotné Nth1, tak jejího komplexu s proteinem Bmh1.

Výsledky těchto studií ukázaly, že vazba proteinu Bmh1 indukuje podstatné změny struktury v několika oblastech pNth1 zahrnující N-koncovou část, kde se váže protein Bmh1, ale také oblast Ca-vazebné a katalytické trehalasové domény pNth1. Změny konformace katalytické domény pNth1 patrně umožňují její lepší přístupnost pro substrát a tak aktivaci tohoto enzymu. Vazebné rozhraní proteinu Bmh1 nezahrnuje jen ligand-vazebný žlábek, do kterého se váže fosforylovaná N-koncová část pNth1, ale také oblasti vně centrálního kanálu dimeru tohoto proteinu. Struktura s nízkým rozlišením odhalila, že oblast Nth1 obsahující EF-hand motiv tvoří samostatnou Ca-vazebnou doménu, která interaguje jak s proteinem 14-3-3, tak s katalytickou trehalasovou doménou Nth1. Integrita EF-hand motivu je klíčová pro aktivaci Nth1 prostřednictvím proteinu Bmh1 i pro vazbu kationtů $Ca^{2+}$. Aktivace pNth1 prostřednictvím proteinů Bmh1 společně s kationty $Ca^{2+}$ je více účinná než aktivace v nepřítomnosti těchto kationtů. Předpokládáme, že kationty $Ca^{2+}$ celý proces aktivace pNth1 usnadňují, i když pro tento proces nejsou bezpodmínečně nutné. Ze získaných dat navíc vyplývá, že Ca-vazebná doména obsahující EF-hand motiv funguje jako jakýsi prostředník, skrze kterého Bmh1 moduluje funkci katalytické domény Nth1.

Naše studie komplexu kvasničného proteinu 14-3-3 s plně aktivním enzymem pNth1 poskytuje jedinečný strukturní pohled na klíčový regulační mechanismus tohoto enzymu. Navíc je také první detailnější strukturní studií neutrální trehalasy pocházející z eukaryotického organismu. Získané výsledky mohou přispět nejen k lepšímu porozumění metabolismu trehalosy v kvasinkách rodu *Saccharomyces cerevisiae*, ale také úlohy proteinů 14-3-3 v regulaci funkce jiných proteinů.