

# Abstrakt CZ

Lidská ubikvitin ligasa Nedd4-2 (NEDD4L) ubikvitinuje široké spektrum membránových proteinů a receptorů a hraje tak klíčovou roli v udržování homeostázy organismu. Tento enzym je regulován fosforylací a následnou interakcí s proteiny 14-3-3, čímž je primárně ovlivněna schopnost proteinu Nedd4-2 interagovat s různými substráty. Jen velmi málo je však známo o molekulární podstatě této protein-proteinové interakce. V této práci jsme se zaměřili na biofyzikální charakterizaci úlohy jednotlivých fosforylačních míst a mapování strukturních změn Nedd4-2 způsobených vazbou proteinů 14-3-3. Naše experimenty za užití metod analytické ultracentrifugace odhalily, že k stabilní vazbě proteinu Nedd4-2 na proteiny 14-3-3 je zapotřebí primárně dvou fosforylačních míst Ser<sup>342</sup> a Ser<sup>448</sup>. Krystalová struktura komplexu 14-3-3 $\eta$  $\Delta$ C:Nedd4-2<sup>335-455</sup>T367A poté odhalila simultánní vazbu obou fosforylovaných reziduí do vazebného žlábků proteinu 14-3-3. Modelování na základě dat z malouhlového rozptylu rentgenového záření a chemického zesílení spojeného s hmotnostní spektrometrií nastínilo rozsáhlé strukturní změny v oblasti jednotlivých domén proteinu Nedd4-2. Vazba proteinu 14-3-3 $\eta$  blokuje doménu WW3 proteinu Nedd4-2 v centrálním kanálu proteinu 14-3-3 a zároveň mění vzájemné pozice domén WW2 a WW4. WW domény Nedd4-2 jsou zodpovědné za následné rozpoznávání substrátů a změny v přístupnosti jednotlivých WW domén tak mohou objasnit, jak protein 14-3-3 moduluje ubikvitinaci některých substrátů ubikvitin ligasy Nedd4-2. Získané poznatky tak přinášejí první strukturní náhled do molekulární podstaty mechanismu regulace proteinu Nedd4-2 prostřednictvím proteinů 14-3-3.