

## Abstrakt

Posttranslační modifikace prostřednictvím ubikvitinace hrají klíčovou roli v regulaci membránových proteinů. Nedd4-2, lidská HECT E3 ubikvitin ligáza, je poslední komponentou ubikvitinační kaskády, která přenáší molekuly ubikvitinu a spouští endocytózu svých následných cílových molekul. Dysregulace Nedd4-2 může způsobovat různé poruchy, včetně epilepsie, respirační úzkosti a Liddleova syndromu. Přestože se na regulaci Nedd4-2 podílejí různé adaptorové proteiny, v tomto výzkumu jsme se zaměřili na konzervované proteiny 14-3-3, známé negativní regulátory Nedd4-2. V této studii jsme provedli biofyzikální charakterizaci konstruktů Nedd4-2<sup>190-581</sup> a Nedd4-2<sup>186-975</sup> v komplexu s 14-3-3, abychom získali další náhled do dynamiky této interakce. Naše výsledky časově rozlišené fluorescenční spektroskopie odhalily, že vazba 14-3-3 ovlivňuje emisní vlastnosti a pohyblivost specifických WW domén (WW3 a WW4) Nedd4-2, zatímco ostatní (WW1) šetří. Zajímavé je, že katalytická doména HECT prochází při tvorbě komplexu konformačními změnami a zvýšenou exponovaností rozpouštědla. Předpokládáme, že sterická inhibice domén WW3 a WW4 v kombinaci s konformačními změnami v katalytické doméně může být základem regulačního mechanismu zprostředkovaného vazbou proteinem 14-3-3. Chemické zesílení spolu s hmotnostní spektrometrií a experimenty s limitovanou proteolýzou dále objasňují rozsáhlé strukturní změny v doménách Nedd4-2 v přítomnosti proteinů 14-3-3, což podtrhuje ochrannou roli 14-3-3 proti proteolytické degradaci. Naše komplexní zjištění tedy celkově vrhají světlo na složité molekulární mechanismy řídící regulaci Nedd4-2 zprostředkovanou vazbou 14-3-3 a nabízejí cenné poznatky pro lepší pochopení regulace funkcí membránových proteinů zprostředkované ubikvitinem a její možné úlohy u různých patologických stavů.