

## Abstrakt

Předkládaná disertační práce volně navazuje na mou práci diplomovou. Zabývá se studiem 30kDa proteinu fosducinu (Pdc) a mechanismem regulace jeho funkce prostřednictvím vazby s 28kDa adaptorovým proteinem 14-3-3. Oba tyto proteiny se účastní signální dráhy spojené s G-proteiny, především v procesu vidění. Pdc váže komplex  $\beta\gamma$  podjednotek heterotrimerního G-proteinu transducinu ( $G_t\beta\gamma$ ) a tím brání zpětné reasociaci  $G_t\beta\gamma$  s podjednotkou  $G_t\alpha$ , čímž blokuje přenos světelného signálu. Tento proces se pravděpodobně uplatňuje při dlouhodobé adaptaci na změnu intenzity světla. Regulační funkce Pdc je dále regulována jeho fosforylací a následnou vazbou na protein 14-3-3. Na základě dostupných dat bylo spekulováno, že vazba 14-3-3 je klíčová pro inhibici interakce mezi fosforylovaným Pdc (Pdc-PP) a  $G_t\beta\gamma$ . Vznik komplexu 14-3-3/Pdc-PP pak vede k reasociaci trimerního transducinu a zesílení přenosu světelného signálu. Mechanismus, jakým protein 14-3-3 inhibuje interakci Pdc s  $G_t\beta\gamma$ , je však stále neznámý.

Cílem této disertační práce bylo objasnit strukturu volného Pdc a jeho komplexu s proteinem 14-3-3 a s pomocí získaných dat navrhnout mechanismus regulace funkce Pdc. Struktura Pdc a komplexu 14-3-3/Pdc-PP byla studována celou řadou biofyzikálních metod včetně malouhlového rozptylu rentgenového záření (SAXS), NMR, H/D výměny spojené s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS) či metod fluorescenční spektroskopie. Získané výsledky ukázaly, že N-terminální doména Pdc (Pdc-ND) je vnitřně nestrukturovaný protein. Fosforylace Pdc ovlivňuje konformaci nejen v rámci Pdc-ND, kde se nacházejí obě fosforylační místa, ale i v rámci strukturované C-terminální domény (Pdc-CD). Protein 14-3-3 váže Pdc-PP s mikromolární vazebnou afinitou a tvorba komplexu ovlivňuje konformaci a snižuje flexibilitu zejména fosforylované Pdc-ND. Obě fosforylační místa Pdc jsou klíčová pro vazbu proteinu 14-3-3. Velká část Pdc-ND, která tvoří většinu vazebného povrchu Pdc pro  $G_t\beta$ , se v komplexu se 14-3-3 nachází buď v centrálním kanálu molekuly dimeru 14-3-3, nebo v blízkosti jeho povrchu. Vazba 14-3-3 tedy blokuje vazebný povrch Pdc pro  $G_t\beta$  a tím inhibuje tuto interakci. NMR a HDX-MS měření dále ukázala, že Pdc-PP zůstává i po navázání na protein 14-3-3 flexibilní, což naznačuje, že by se mohlo jednat o tzv. „fuzzy“ komplex. Získané výsledky také naznačují, že vazba proteinu 14-3-3 zpomaluje defosforylací Pdc-PP.