

Závěr

Hlavním cílem této doktorské práce bylo objasnění molekulárních mechanismů funkce 14-3-3 proteinů a vlivu na proteiny FOXO4 a tyrosinhydroxylasu.

V první části této práce (publikace I) byla potvrzena předložená hypotéza polohy Cterminálního konce molekuly 14-3-3. Bylo ukázáno, že v nepřítomnosti ligandu se Cterminální konec nachází ve vazebném místě a brání tak vstupu ligandů. Po vazbě fosforylovaných ligandů, dochází k velmi silné vazbě a vytěsnění C-terminálního konce 14-3-3 proteinu z vazebného místa. Tyto výsledky jsou v souladu s původními pracemi, které navrhly důležitost tohoto segmentu jako inhibitoru nepatřičných ligandů.

Druhá část této doktorské práce poskytuje rozsáhlý popis vlivu 14-3-3 proteinů na transkripční faktory FOXO4. S použitím stacionární a časově-rozlišené fluorescence byla studována interakce 14-3-3 proteinu s fosforylovaným transkripčním faktorem FOXO4. Navázání 14-3-3 proteinu způsobuje rozpad komplexu FOXO4:DNA. Tato část práce charakterizuje interakci 14-3-3 proteinu s DNA-vazebnou doménou FOXO4. Výsledky neprokázaly výrazné konformační změny v rámci DNA-vazebné domény. Spíše dochází ke sterickému bránění vazby DNA (publikace II).

Ve třetí části se práce zabývá studiem interakcí 14-3-3 s fosforylovaným ligandem odvozeným od C-konce enzymu serotonin N-acetyltransferasa (AANAT). Na předložené krystalové struktuře je ukázána struktura tohoto peptidu ve vazebném místě proteinu 14-3-3. Těchto několik aminokyselin včetně fosforylačního místa pro kinasu PKA, je důležitých pro ochranu AANAT před proteolytickou degradací. 14-3-3 váže oba motivy na AANAT a stericky brání přístupu proteas. Naše struktura přispěla k dořešení zbývajících částí tohoto enzymu a prokázala, že i takovýto motiv na okraji C-terminálního konce vazebného partnera je schopen pevné a jasně definované vazby na 14-3-3 protein.

Čtvrtá část se zabývá úlohou fosforylace C-koncové části forkhead domény proteinu FOXO4 a jejího vlivu na DNA-vazebnou afinitu (publikace III). PKB kinasa fosforyluje protein FOXO4 na třech místech, přičemž jedno se nachází přímo ve forkhead DNA-vazebné doméně a to na jejím C-konci v oblasti křídla W2. Zjistili jsme, že v přítomnosti N-koncové smyčky má fosforylace křídla W2 proteinkinasou B pouze malý vliv na vazbu DNA. Na druhé straně v nepřítomnosti této smyčky fosforylace křídla W2 silně inhibuje DNA vazebný potenciál FOXO4-DBD. Vazba 14-3-3 proteinu efektivně snižuje DNA vazebný potenciál FOXO4-DBD, ať už je N-koncová smyčka přítomna nebo ne. Naše výsledky ukazují, že jak N-koncová, tak C-koncová část FOXO4-DBD jsou důležité pro stabilitu FOXO4-DBD:DNA komplexu.

Cílem poslední části této doktorské práce bylo popsat efekt vazby 14-3-3 proteinu na strukturu fosforylované regulační domény lidské tyrosinhydroxylasy (TH) (publikace IV). S použitím různých metod tryptofanové fluorescenční spektroskopie jsme ukázali, že vazba 14-3-3 proteinu způsobuje konformační změnu regulační oblasti fosforylované TH. Tak jako u AANAT i zde byla pozorována zvýšená stabilita vůči proteolytické degradaci po vazbě 14-3-3 proteinu.