

Abstrakt

Předkládaná diplomová práce se zabývá studiem úlohy posttranslačních modifikací fosducinu na jeho interakci s proteinem 14-3-3 a dále posouzení vlivu tvorby komplexu na tyto modifikace.

Fosducin je 33kDa protein nacházející se ve fotoreceptorových buňkách sítnice, ale také v jiných tkáních. Přes mnohé experimenty jsou však jeho fyziologické funkce stále řešeným tématem. Spekuluje se o jeho vlivu při regulaci signální dráhy oční sítnice, krevního tlaku a exprese G-proteinů. Funkce fosducinu je regulována proteinem 14-3-3, jenž hraje roli v mnohých biochemických procesech. Tvorba komplexu mezi proteinem 14-3-3 a fosducinem vyžaduje fosforylaci dvou serinových zbytků v N-terminální doméně molekuly fosducinu. Úloha vazby proteinu 14-3-3 v regulaci funkce fosducinu je ovšem stále nejasná.

V rámci této diplomové práce byly exprimovány proteiny 14-3-3 $\zeta\Delta$ C a fosducin (s mutací Q52K) a úspěšně purifikovány. Ke studiu vlivu tvorby komplexu na posttranslační modifikace fosducinu bylo využito limitované proteolýzy a defosforylace. Experimenty ukázaly, že tvorba komplexu způsobuje významné zpomalení defosforylace Ser-54 i Ser-73 a proteolytické degradace, což indikuje protektivní funkci vazby proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C. Úloha obou 14-3-3 $\zeta\Delta$ C vazebných motivů obsahujících Ser-54 a Ser-73 pro interakci fosducinu s proteinem 14-3-3 $\zeta\Delta$ C byla zkoumána měřením stacionární anizotropie fluorescence syntetických fosfopeptidů. Výsledky ukázaly obdobné vazebné afinity obou studovaných motivů, čímž poukazují na stejný význam motivů pro interakci fosducinu s proteinem 14-3-3 $\zeta\Delta$ C.