

Abstrakt

Předkládaná diplomová práce se zabývá biofyzikální charakterizací komplexu dvou regulačních proteinů, fosducinu (Pd) a 14-3-3. Oba proteiny jsou zapojeny do regulační kaskády přenosu signálu v oční sítnici obratlovců. Pd je 33kDa protein nacházející se ve fotoreceptorových buňkách sítnice, ale také i v jiných tkáních. Za jeho hlavní funkci v oku se považuje regulace přenosu signálu jdoucího z oka k očnímu nervu, jako odpověď na ostré světlo, a to vazbou $G_{t\beta\gamma}$ podjednotky heterotrimerního transducinu, jež je součástí tzv. G-proteinové signální dráhy. Vazba znemožní spojení $G_{t\beta\gamma}$ s $G_{t\alpha}$ transducinu, což zabrání dalšímu přenosu signálu. Dysfunkce Pd by v důsledku dopadu intenzivního světla vedla k poškození sítnice. Dále se také zjistilo, že Pd ovlivňuje hypertensi a to tak, že snižuje krevní tlak u lidí a myši ve spánku. Ve tmou adaptované sítnici je funkce Pd regulována 14-3-3 proteinem. 14-3-3 je 28kDa protein nacházející se v mnohých tkáních eukaryot, především v mozku, a hrající roli v mnohých biochemických procesech, např. apoptose. Role 14-3-3 v sítnici oka spočívá ve vazbě fosforylovaného Pd, jeho udržení ve vnitřním segmentu tyčinek a zabránění tak jeho vazbě s $G_{t\beta\gamma}$, čímž se zajistí další možnost přenosu signálu k očnímu nervu. Pro vazbu je nutná fosforylace Pd na Ser54 a Ser73. Tvorba homodimeru 14-3-3 je nezbytná pro jeho funkci. Možná je i ochrana Pd vůči *proteasam* a *fosfatasam*.

Během diplomové práce byly exprimovány proteiny Pd wt, PdQ52K, PdQ52KS73A, 14-3-3 ζ wt a 14-3-3 ζ noW v bakteriálním systému *E.coli* BL21(DE3) a úspěšně purifikovány s výtěžkem miligramových množství. Bylo použito několika biofyzikálních technik ke studiu komplexu. Nativní elektroforéza ověřila vznik komplexu po fosforylaci obou fosforylačních míst Pd (Ser54, Ser73), limitovaná proteolýza odhalila strukturní změny Pd po jeho vazbě se 14-3-3, analytická ultracentrifugace ukázala, že stechiometrie komplexu 14-3-3/Pd je 2:1, tedy dva monomery 14-3-3 vážou jeden fosducin. Dále byla touto technikou odhadnuta disociační konstanta komplexu K_d s výsledkem 5 μ M. Měření časově-rozlišeného dohasínání anizotropie Trp fluorescence umožnilo pozorovat změny flexibility Pd při vzniku komplexu z Pd fosforylovaného v obou místech, oproti mutantům Pd, kde je pouze jedno fosforylační místo (Ser54, nebo Ser73). Nebyl pozorován signifikantní vliv samotné fosforylace na strukturu Pd.