

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá interakcí proteinu 14-3-3 a fosducinu, které se podílejí na regulaci přenosu signálu v oční sítnici obratlovců. Tento přenos a zároveň i zesílení signálu jsou zprostředkovány G-proteinovou signální dráhou. Přenos signálu v závislosti na intenzitě světla je regulován dalšími proteiny včetně fosducinu.

Fosducin je 33kDa protein, který je exprimován v mnoha tkáních, především ve fotoreceptorových buňkách oční sítnice. Jeho regulační funkce spočívá v inhibiční funkci G-proteinu (transducinu). Při přenosu signálu je nutný rozpad transducinu $G_i\alpha\beta\gamma$ na podjednotku α ($G_i\alpha$) a komplex $\beta\gamma$ ($G_i\beta\gamma$). Pro opětovnou funkci je nutná reasociace heterotrimeru $G_i\alpha\beta\gamma$, čemuž zabraňuje fosducin, a to vazbou na komplex $G_i\beta\gamma$. Nepřítomnost kompletního transducinu má za následek přerušení signální dráhy a snížení přenosu signálu. Při slabém osvětlení je nutné přenášený signál zesílit, a proto je v sítnici adaptované na tmu fosducin fosforylován, což rozruší jeho vazbu s $G_i\beta\gamma$ podjednotkou a obnoví funkci transducinu. Fosforylovaný fosducin je vázán proteinem 14-3-3. Úloha proteinu 14-3-3 v regulaci funkce fosducinu je však stále nejasná.

Protein 14-3-3 je 28 kDa protein, který je exprimován ve všech eukaryotických buňkách. Jedná se o protein s rigidní strukturou, který váže a reguluje funkce více než tři sta proteinů, čímž se účastní velké škály biochemických procesů. Ve fotoreceptorových buňkách dokáže vázat fosducin fosforylovaný na Ser-54 a Ser-73. Touto vazbou inhibuje jeho interakci s komplexem $G_i\beta\gamma$ a podílí se tak na regulaci přenosu signálu. Zároveň pravděpodobně chrání fosforylovaný fosducin od účinku fosfatas a proteas.

Během této bakalářské práce byly exprimovány mutantní proteiny fosducinu (PdQ52K) a proteinu 14-3-3 ζ (14-3-3 ζ noW) v bakteriálním systému *E. coli* BL21(DE3) a úspěšně purifikovány s výtěžky miligramových množství. Ke studiu interakce mezi N-terminální částí fosducinu a proteinem 14-3-3 bylo využito měření akrylamidem zhasené fluorescence Trp-29 proteinu PdQ52K v nepřítomnosti a přítomnosti proteinu 14-3-3 ζ noW. Z měření byly vypočteny hodnoty Sternovy-Volmerovy konstanty, které naznačují, že vazba proteinu 14-3-3 ζ noW nemá signifikantní vliv na N-terminální oblast molekuly PdQ52K obsahující Trp-29.