

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**  
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie



## **Autoreferát doktorské práce**

Studium interakce forkhead transkripčního faktoru FOXO4  
s DNA a s proteinem 14-3-3

**RNDr. Petr Vácha**

## Abstrakt

Tato doktorská práce se zabývá studiem interakcí lidského forkhead transkripčního faktoru FOXO4 s DNA a s regulačním proteinem 14-3-3. Hlavním cílem této práce byla detailní charakterizace interakce DNA-vazebné domény proteinu FOXO4 se dvěmi kanonickými sekvencemi DNA a dále objasnění úlohy proteinu 14-3-3 v procesu regulace funkce FOXO4.

Transkripční faktory FOXO jsou účinnými aktivátory transkripce genů, čímž ovlivňují celou řadu buněčných procesů. Protein FOXO4 patří do rodiny forkhead transkripčních faktorů, což je skupina několika desítek proteinů, jejichž společným znakem je velmi konzervovaná DNA-vazebná doména. Podstata DNA-vazebné specifity těchto proteinů, tedy co přesně determinuje drobné odlišnosti ve vazebných vlastnostech jednotlivých forkhead proteinů, je i přes množství dostupných strukturních dat stále nejasné. Proto byla provedena detailní charakterizace interakcí mezi DNA-vazebnou doménou proteinu FOXO4 a DNA pomocí rezonance povrchového plazmonu (SPR) a časově-rozlišené fluorescenční spektroskopie. Výsledky této práce umožnily objasnit kinetický model vazby FOXO4 na DNA, charakterizovat konformační změnu FOXO4 při tvorbě komplexu s DNA a zároveň i vliv jednotlivých aminokyselinových zbytků na stabilitu komplexu FOXO4 s DNA.

Funkce proteinu FOXO4 je regulována prostřednictvím fosforylace a vazby proteinu 14-3-3, který je svým charakterem regulátorem mnoha buněčných procesů. Detailní mechanismus této regulace je však stále nejasný. Protein 14-3-3 ovlivňuje transkripční faktory FOXO hned dvojím způsobem. Prostřednictvím přímé vazby na transkripční faktor FOXO dochází jednak k inhibici vazby FOXO na DNA a dále je touto interakcí překryta jaderná lokalizační sekvence (NLS), což brání transportu FOXO proteinů do jádra. Ke studiu interakce těchto dvou vazebných partnerů bylo použito rovněž metod fluorescenční spektroskopie. Pomocí časově rozlišené fluorescence přirozených či introdukovaných fluorescenčních sond bylo prokázáno, že při navázání proteinu 14-3-3 dochází k ovlivnění několika částí DNA vazebného rozhraní FOXO4. Získané výsledky poukazují na to, že změny ve studovaných oblastech se dějí na základě přímého kontaktu struktur těchto dvou vazebných partnerů. Pro efektivní popis sledovaných změn jsme navrhli realistický strukturní model komplexu FOXO4:14-3-3 na základě šesti intermolekulárních vzdáleností získaných pomocí Försterova rezonančního přenosu energie. Tento model jasně ukazuje, že FOXO4 je umístěn hluboko uvnitř centrálního kanálu dimeru proteinu 14-3-3 a jeho DNA vazebné rozhraní je touto interakcí blokováno.