

ABSTRAKT

Mitogénmi aktivované proteínové kinázy (MAPK) sú najdôležitejšou súčasťou bunkového obranného systému proti stresu. Schopnosť a účinnosť bunkových reakcií na rôzne stresové signály závisí na signálnych dráhach, kde signály z MAPK kinázy kinázy (MAP3K) sú prenášané pomocou fosforylácie na nižší stupeň kaskády tvorený MAPK kinázami (MAP2K) a následne rovnakým spôsobom na MAPK, ktoré tvoria najnižší stupeň signalizačnej kaskády. ASK1 kináza (z angl. Apoptosis signal-regulating kinase 1) je členom MAP3K rodiny a jej aktivácia a inhibícia má významnú rolu v regulácii bunkovej odpovedi na stresové podnety. Regulácia ľudskej formy ASK1 kinázy má silný vplyv na patogenézu mnohých ochorení, jej nadmerná aktivácia, alebo porucha kontroly jej funkcie je spojená s radou kardiovaskulárnych chorôb, neurodegeneratívnych porúch, zápalových ochorení, infekčných ochorení, bunkovým starnutím a s vznikom nádorov, astmy a cukrovky. Aktivita ASK1 je regulovaná interakciami s rôznymi proteínmi, pozornosť je ale sústredená najmä na dva fyziologické inhibítory, cicavčí tioredoxín (TRX) a proteín 14-3-3. Explicitný mechanizmus inhibície ASK1 vytváraním väzieb s TRX a 14-3-3 je však nejasný, vzhľadom na neexistujúce štruktúrne dáta týchto interakcií.

Táto diplomová práca je súčasťou rozsiahleho výskumu ľudskej ASK1 a zameriava sa na biofyzikálnu charakteristiku interakcie medzi ASK1 a TRX. Veríme, že pochopenie štruktúry ASK1 kinázy je rozhodujúce pre akýkoľvek zásah do jej regulácie a že kontrolovaná inhibícia molekuly ASK1 môže byť významná pre liečebný plán rôznych chorôb. Cieľom tejto práce je štruktúrna charakterizácia TRX väzbovej domény N-terminálnej časti ľudskej ASK1 kinázy (ASK1-TBD) a ASK1-TBD:TRX komplexu, a to využitím niekoľkých biofyzikálnych prístupov: natívna elektroforéza testujúca interakcie medzi ASK1 a TRX, dynamický rozptyl svetla pre štúdium polydisperzity a agregácie proteínov, cirkulárny dichroizmus pre štúdium sekundárnej štruktúry proteínov a malo-uhlový rozptyl svetla pre získanie štruktúry ASK1 kinázy s nízkym rozlíšením.

Výsledky ukázali, že ASK1-TBD je rigidná a monoména doména a vytvára stabilný komplex s TRX s veľkým väzbovým rozhraním. Katalytický motív TRX je nevyhnutný pre naviazanie na ASK1 a interakcia nie je spojená s tvorbou medzimolekulárnych disulfidových mostíkov. ASK1-TBD má kompaktný a mierne asymetrický tvar a interaguje s TRX bez vyvolania dramatickej konformačnej zmeny.