

## Abstrakt

MAP kinasová signalizační kaskáda hraje důležitou roli při vzniku buněčných odpovědí na různé stresové podněty z vnějšího prostředí. Tato signalizační kaskáda je třístupňová: MAP kinasy kinasy kinasy (MAP3K) fosforylací aktivují MAP kinasy kinasy (MAP2K) a ty následně fosforylují a tím aktivují MAP kinasy (MAPK), čímž regulují spoustu buněčných funkcí jako je apoptosa, buněčné dělení či morfogenese. Jednou z důležitých MAP3K je proteinkinasa ASK1 (z angl. apoptosis signal-regulating kinase 1), která je důležitým regulátorem imunitních a stresových buněčných odpovědí. Vzhledem k tomu, že zvýšená aktivita ASK1 souvisí s rozvojem závažných onemocnění, jako jsou např. rakovina, kardiovaskulární a neurodegenerativní onemocnění, je ASK1 zajímavým cílem ve farmacii při vývoji nových léčiv. Lidská ASK1 sestává z 1374 aminokyselin a dělí se na tři domény: centrální Ser/Thr katalytickou doménu a dvě coiled-coil domény, z nichž první se nachází na N- a druhá na C-konci molekuly této proteinkinasy. ASK1 je regulována pomocí svých vazebných partnerů, mezi které patří také malý celulární redoxní protein thioredoxin (Trx-1), který se váže na N-terminální část ASK1. Trx-1 je silným antioxidantem a chrání tak buňky před toxickými podněty z okolí. Mechanismus regulace aktivity ASK1 pomocí Trx-1 je jedním z nejvíce studovaných a přestože ještě není zcela vyřešen, zdá se, že probíhá díky redoxním reakcím probíhajícím na Trx-1. Interakce s ASK1 je schopný pouze redukovaný Trx-1, při jeho oxidaci dochází k disociaci.

Cílem této práce bylo: (i) příprava Trx-1 a čtyř různě dlouhých fragmentů N-terminální části ASK1; (ii) základní biofyzikální charakterizace připravených proteinů; a (iii) studium interakcí mezi fragmenty ASK1 a Trx-1 kvůli upřesnění polohy vazebného místa pro Trx-1. Výsledky ukázaly, že pouze dva ze čtyř připravených fragmentů ASK1 jsou rozpustné (sekvence 46-302 a 88-302). Dále bylo zjištěno, že oba tyto fragmenty interagují s Trx-1 v redukčních podmínkách se stejnou vazebnou afinitou. Závěrem lze říci, že vazebné místo pro Trx-1 v molekule ASK1 se nachází v oblasti 88-302 a že tato oblast vytváří doménu, kterou lze samostatně připravit a použít jako model pro studium interakcí mezi ASK1 a Trx-1.