

## Abstrakt

Proteiny 14-3-3 skrze vazbu více než 300 vazebných partnerů regulují značné množství biologicky významných dějů, např. apoptosu, buněčný cyklus, přenos signálu či metabolické dráhy. V rámci této disertační práce byla studována úloha proteinů 14-3-3 v regulaci dvou vybraných proteinkinas ASK1 a CaMKK2. Hlavním cílem práce bylo pochopit strukturní podstatu mechanismů, kterými fosforylace a vazba proteinů 14-3-3 regulují aktivitu těchto proteinkinas pomocí různých biochemických a biofyzikálních metod, zejména metod bodové mutagenese, měření enzymové aktivity, analytické ultracentrifugace, malouhlového rozptylu rentgenového záření, chemického zesíťení, nukleární magnetické rezonance a fluorescenční spektroskopie.

Na základě získaných dat z malouhlového rozptylu rentgenového záření a chemického zesíťení byl navrhnout model struktury komplexu katalytické domény proteinkinasy ASK1 s proteinem 14-3-3ζ, který ukázal, že tento komplex je v roztoku konformačně heterogenní. Tento strukturní model společně s daty z časově rozlišené fluorescence a nukleární magnetické rezonance částečně vysvětlují inhibiční mechanismus proteinu 14-3-3. Získané výsledky ukázaly, že protein 14-3-3ζ interaguje s katalytickou doménou ASK1 v těsné blízkosti aktivního místa, a proto by tato interakce mohla mít vliv na strukturu nebo přístupnost této oblasti. Fyziologickým inhibitorem proteinkinasy ASK1 je i protein thioredoxin. Dalším výsledkem této disertační práce bylo zjištění, že tvorba cystinového můstku mezi Cys<sup>32</sup> a Cys<sup>35</sup> v katalytickém centru thioredoxinu je hlavním faktorem, který je odpovědný za disociaci komplexu thioredoxinu 1 s thioredoxin-vazebnou doménou ASK1 při oxidaci.

Pro pochopení úlohy, kterou proteiny 14-3-3 hrají v regulaci proteinkinasy CaMKK2 byl na základě dat z malouhlového rozptylu rentgenového záření navržen strukturní model komplexu proteinkinasy CaMKK2 s isoformou 14-3-3γ. Tento model naznačil, že v komplexu se katalytická doména CaMKK2 nachází mimo centrální kanál dimeru 14-3-3γ, přičemž 14-3-3γ přímo interaguje a ovlivňuje strukturu této domény CaMKK2, tedy mimo oblasti obsahující 14-3-3 vazebné motivy.

Výsledky této práce potvrzují, že proteiny 14-3-3 jsou důležitými alosterickými modulátory proteinkinas ASK1 a CaMKK2.