

Abstrakt

Protein-proteinové interakce se podílejí na celé řadě biologických procesů. Podrobná charakterizace jejich strukturní podstaty je důležitým nástrojem k pochopení s nimi spojených základních molekulárních mechanismů. Získané informace jsou důležité nejen pro biologii, ale také hrají důležitou roli při hledání míst vhodných pro terapeutickou intervenci. Ve strukturní biologii je nukleární magnetická rezonanční spektroskopie (NMR) spolu s rentgenovou krystalografií a jednočásticovou kryo-elektronovou mikroskopií jednou z klíčových technik s vysokým rozlišením. Její použití fyzicky limitováno velikostí studovaných molekul, ale tuto nevýhodu vynahrazuje unikátní možností pracovat s dynamickými nebo heterogenními systémy.

V této disertační práci byla pro detailní strukturní charakterizaci vybraných biologicky významných proteinů a jejich komplexů využita právě NMR poskytující důležité informace o jejich biologických rolích. Ve třech různých projektech jsem studovala (i) vztah mezi strukturními účinky konkrétních modifikací inzulinového růstového faktoru II (IGF-II) a jejich selektivitou k receptorům inzulinové osy, (ii) specifický vazebný mechanismus domény SH3 adaptorového proteinu CAS, a (iii) strukturní podstatu vazby fosfatidylinositol 4-kinázy beta (PI4KIII β) na buněčnou membránu. Pro strukturní studie analogů IGF-II jsem vyvinula účinný purifikační protokol, připravila řadu modifikovaných proteinů s upravenou preferencí pro příbuzné receptory a strukturně charakterizovala analogy, které vykazovaly výrazně sníženou vazbu k inzulinovému receptoru. Získané strukturní informace naznačují, že pro specifitu vazby na receptor má klíčovou roli semi-flexibilní C-doména IGF-II. V projektu zaměřeném na to, jakým způsobem rozpoznává CAS SH3 doména své ligandy, jsem řešila struktury volné CAS SH3 domény a domény v komplexu se dvěma motivy polyprolinových peptidů odvozených od tyrosin fosfatázy PTP-PEST nebo od cytoskeletálního proteinu Vinculin. Strukturální data ukázala podrobnosti vazebného mechanismu CAS SH3, naznačila, že vazba ligandu CAS SH3 je negativně regulována fosforylací zprostředkovanou Src a vedla k identifikaci dvou nových buněčných vazebných partnerů CAS. Při hledání rozhodujících aspektů v cílení PI4KIII β na membránu jsem určila strukturu komplexu tvořeného N-terminální oblastí PI4KIII β kinázy a PolyQ doménou ACBD3. Struktura odhalila podrobný mechanismus, na kterém je založena vazba PI4KIII β k membráně.