

ABSTRAKT

Všechny živé organismy jsou v průběhu života vystaveny rozličným formám stresu. Možná právě proto se vyvinul evolučně velmi dobře konzervovaný systém MAPK (z anglického *mitogen-activated protein kinase*) signálních kaskád regulující buněčnou odpověď na stres. Tyto signální dráhy se skládají ze tří následujících tříd proteinkinasy MAP3K, MAP2K a MAPK. Z MAPK je poté signál přenášen na další proteinkinasy nebo transkripční faktory.

Proteinkinasa ASK1 (z anglického *apoptosis signal-regulating kinase 1*) je členem MAPK dráhy, konkrétně se řadí do třídy MAP3K, tedy mitogeny aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa. Lidská ASK1 je protein složený z 1374 aminokyselin uspořádaných do několika domén a sekvenčních motivů. Třemi hlavními doménami jsou N-terminální coil-coiled doména (NCC), serin/threoninová kinasová doména a C-terminální coil-coiled doména (CCC). Dále bylo v sekvenci charakterizováno několik míst, která jsou zodpovědná za interakci ASK1 s jejími vazebnými partnery. Aktivita ASK1 je totiž regulována různými faktory, mezi něž patří inhibitory thioredoxin a 14-3-3 proteiny. Naopak faktory TRAF (z anglického *TNF receptor associated factor*) proteinkinasy aktivují.

Cílem této práce byla příprava šesti variant expresních konstruktů N-terminálního úseku sekvence lidské ASK1, který by měl být zodpovědný za tvorbu komplexu ASK1 s thioredoxinem. C konce sekvence proteinu byly vybírány tak, aby nedošlo k poškození předpokládané sekundární struktury. Dále byl připraven nový expresní konstrukt thioredoxinu (konkrétně sekvence lidského thioredoxinu s bodovou mutací zabraňující tvorbě dimerů označované C73S, kdy je cystein 73 změněn na serin), umožňující po purifikaci fúzního proteinu odštěpit purifikační histidinovou kotvu a získat tak téměř nativní formu proteinu.