

Abstrakt

Proteinkinasa ASK1 (z angl. apoptosis signal-regulating kinase 1) patří do rodiny mitogeny aktivovaných proteinkinás kinas kinas (tzv. MAP3K) a hraje důležitou roli v imunitních a stresových odpovědích. Vzhledem k souvislosti mezi její zvýšenou aktivitou a rozvojem nemocí jako např. rakovina, kardiovaskulární a neurodegenerativní onemocnění, je tato bílkovina perspektivní cíl pro vývoj léčiv. Celý enzym se skládá z 1374 aminokyselinových zbytků (lidská ASK1), ale katalyticky aktivní je pouze Ser/Thr kinasová doména nacházející se přibližně uprostřed molekuly. Aktivita ASK1 je regulována prostřednictvím interakcí s různými proteiny včetně proteinu 14-3-3. Tento protein se váže na fosforylovaný serinový zbytek ASK1 v pozici 966 na C-konci katalytické domény. Tato vazebná interakce má za následek inhibici ASK1 prostřednictvím zatím neznámého mechanismu. Při stresovém signálu, nejčastěji při oxidativním stresu, se ASK1 na Ser966 defosforyluje a protein 14-3-3 disociuje. Rozpad komplexu ASK1:14-3-3 je jedním z dějů, které vedou k aktivaci ASK1.

Cílem této práce byla příprava komplexu katalytické domény ASK1 s proteinem 14-3-3 pro následné studium interakcí těchto dvou proteinů. Oba proteiny byly úspěšně exprimovány v buňkách *E. coli* a purifikovány. Dále byly připraveny i různé mutantní formy obou těchto bílkovin. U připravené katalytické domény ASK1 byla ověřena její proteinkinasová aktivita. Katalytická doména ASK1 byla následně fosforylována proteinkinasou A na Ser966 a výsledek fosforylace byl ověřen pomocí hmotnostní spektrometrie. Poté byla studována interakce fosforylované katalytické domény ASK1 s proteinem 14-3-3 ζ metodami nativní elektroforézy a analytické ultracentrifugace. Výsledky ukázaly, že fosforylovaná katalytická doména ASK1 tvoří s proteinem 14-3-3 ζ stabilní komplex, který může být použit pro další strukturní studie.