

Abstrakt

Protein-proteinové interakce jsou klíčové pro většinu fyziologických i patofyziologických dějů. Detailní charakterizace těchto interakcí je proto nezbytná nejen k porozumění podstaty těchto dějů, ale i pro návrh strategií, jak tyto interakce cíleně ovlivňovat. Tato práce se zaměřuje na studium struktury a interakcí několika proteinů a jejich komplexů. ASK1 (z anglického „apoptosis signal-regulating kinase 1“) je mitogeny aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa (MAP3K), která aktivuje dráhy proteinkinasy p38/JNK, čímž směřuje buňky k zánětlivé reakci nebo apoptóze. ASK1 interaguje s thioredoxinem (TRX), malou dithioloxidoreduktasou, která inhibuje ASK1, nicméně mechanismus této inhibice je nejasný. CaMKK1 a CaMKK2 jsou Ca^{2+} /kaldmodulin (CaM)-dependentní proteinkinasy, které regulují např. energetickou rovnováhu buňky, paměť či zánět. Obě jsou inhibovány proteiny 14-3-3, ale navzdory svým doménovým a sekvenčním podobnostem je rozsah inhibice zprostředkovaný proteiny 14-3-3 odlišný. Estrogenový receptor alfa ($\text{ER}\alpha$) je jaderný receptor, který se podílí na vzniku rakoviny prsu. Pro léčbu tohoto onemocnění se používá tamoxifen, antagonist $\text{ER}\alpha$, který však často způsobuje vznik rezistence. Proteiny 14-3-3 interagují s $\text{ER}\alpha$ a inhibují jeho transkripční aktivitu, povaha této interakce je však stále nejasná. Pro lepší pochopení těchto protein-proteinových interakcí jsme provedli biofyzikální a strukturní charakterizaci příslušných proteinů a jejich komplexů. Kryo-EM struktura ASK1 spolu s analýzou pomocí analytické ultracentrifugace ukazují, že ASK1 tvoří kompaktní dimer s rozsáhlým interakčním rozhraním jak mezi doménami v rámci jednoho řetězce, tak mezi řetězci navzájem. Tyto interakce stabilizují aktivní konformaci kinázové domény. Z vodík-deuteriové výměny spojené s hmotnostní spektrometrií je patrné, že vazba TRX ovlivňuje nejen TRX-vazebnou doménu, ale také centrální regulační oblast a aktivační segment v kinasové doméně. Modely komplexů pCaMKK1:14-3-3 γ a pCaMKK2:14-3-3 γ založené na analýze malouhlového rozptylu rentgenového záření ukazují, že pCaMKK1 interaguje s 14-3-3 γ přímo prostřednictvím svého N-lóbu a oblasti aktivního místa, zatímco pCaMKK2 tvoří s 14-3-3 γ minimum kontaktů. Biofyzikální analýza komplexu $\text{ER}\alpha$ /14-3-3 ζ ukazuje, že tento komplex vzniká se stechiometrií 2:2 a že ani mutace $\text{ER}\alpha$ -Y537S, ani vazba ligandu komplex nenarušují, případně nebrání v jeho vzniku. Získané výsledky vysvětlují některé aspekty regulace vybraných proteinových komplexů a naznačují možné způsoby zásahu v případě jejich dysregulace.