

# Abstrakt

$\text{Ca}^{2+}$ -signální dráha je jedním z nejvýznamnějších mechanismů přenosu informace v buňce. Rodina  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin-dependentních proteinkinas (CaMKs) je skupina serin/threonin kinas, jejichž aktivita je regulována intracelulární koncentrací iontů  $\text{Ca}^{2+}$  a vazbou receptorového proteinu iontů  $\text{Ca}^{2+}$  kalmodulinu (CaM). Součástí této proteinové rodiny je tzv.  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -dependentní kaskáda, jejímž členem je  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -dependentní proteinkinasa kinasa (CaMKK), která se u savců nachází ve dvou isoformách, CaMKK1 a CaMKK2.

Aktivita CaMKK1 je regulována nejen vazbou kalmodulinu, ale i fosforylací cAMP-dependentní proteinkinasou A, která zároveň ve struktuře CaMKK1 vytváří vazebné motivy rozpoznávané regulačními proteiny 14-3-3. Dřívější studie interakce CaMKK1 s proteiny 14-3-3 naznačily, že tato interakce nejen udržuje neaktivní CaMKK1 v inhibovaném stavu, ale také znepřístupňuje její aktivní místo a přímo inhibuje aktivitu CaMKK1. Struktura proteinového komplexu, který vzniká mezi CaMKK1 a 14-3-3 proteinem je však stále neznámá.

Hlavním cílem této práce bylo charakterizovat proteinové komplexy vznikající interakcemi mezi CaMKK1, kalmodulinem a proteinem 14-3-3 $\gamma$ , a to pomocí metod analytické ultracentrifugace, maloúhlového rozptylu rentgenového záření, a chemického zesítění spojeného s hmotnostní spektrometrií. Analýza analytickou ultracentrifugací ukázala koncentračně závislou dimerizaci CaMKK1, která je kompletně potlačena vazbou kalmodulinu. Tato analýza také potvrdila tvorbu komplexů CaMKK1:14-3-3 $\gamma$  a CaMKK1: $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}:14-3-3\gamma$ . Analýza pomocí maloúhlového rozptylu rentgenového záření poskytla základní strukturní parametry komplexů, a umožnila následnou rekonstrukci molekulových obálek za využití software ATSAS. Metodou chemického zesítění byla v komplexu CaMKK1: $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}:14-3-3\gamma\Delta\text{C}$  nalezena spojení mezi CaMKK1 a kalmodulinem a také mezi kalmodulinem a proteinem 14-3-3 $\gamma\Delta\text{C}$ , která naznačují, že navázaný  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  je velmi blízko vazebnému žlábkmu dimeru proteinu 14-3-3.