

Abstrakt

Ca²⁺/kalmmodulin-dependentní proteinkinasa kinasa 2 (CaMKK2) patří do rodiny serin/threonin proteinkinasy, které se účastní vápníkové signální dráhy. Při zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých kationtů dochází k aktivaci kalmodulinu (CaM), který následně aktivuje své vazebné partnery, mezi které patří CaMKII, CaMKIII, CaMKK1 a CaMKK2. CaMKK2 následně aktivuje prostřednictvím fosforylace proteinkinasy CaMKI, CaMKIV a AMP-dependentní kinasu, AMPK.

Přirozeně se v buňkách CaMKK2 vyskytuje v autoinhibovaném stavu, který je způsobený sterickým bráněním aktivního místa autoinhibiční doménou. Při vazbě s kalmodulinem dochází k odklonění autoinhibiční domény a tím ke zpřístupnění aktivního místa. Po aktivaci dochází u CaMKK k autofosforylaci a tím ke zvýšení aktivity. Negativní regulace je způsobena fosforylací cAMP-dependentní proteinkinasy A (PKA) a GSK3. Pro CaMKK1 i CaMKK2 byla identifikována místa, která jsou fosforylována PKA. Dvě z nich jsou součástí vazebného motivu pro proteiny 14-3-3. Předchozí studie ukázaly, že protein 14-3-3 udržuje fosforylovanou CaMKK2 v inhibovaném stavu tím, že brání defosforylaci S495, který blokuje vytvoření vazby s kalmodulinem. Nicméně je nejasné, jestli je to jediná úloha proteinu 14-3-3 v regulaci CaMKK2.

Hlavním cílem této diplomové práce byla optimalizace protokolu pro fosforylaci lidské CaMKK2 (rezidua 93-517) obsahující čtyři PKA fosforylační místa, Ser100, Thr145, Ser495 a Ser511, a následně charakterizovat komplex proteinu CaMKK2:14-3-3 $\gamma\Delta$ C pomocí analytické ultracentrifugace metodou sedimentační rychlosti, chemickým zesíťením spojeným s MS, vodík-deuteriovou výměnou spojenou s MS a malouhlovým rozptylem rentgenového záření.

Pomocí analytické ultracentrifugace byla stanovena zdánlivá disociační konstanta pro komplex CaMKK2:14-3-3 $\gamma\Delta$ C. Chemické zesíťení poskytlo informaci o vzájemné orientaci proteinů, vodík-deuteriová výměna poskytla informaci, které oblasti jsou ovlivněny vazbou, a malouhlový rozptyl rentgenového záření společně s počítačovým modelováním poskytly základní strukturní parametry, tvar molekulových obálek a vytvoření přibližného modelu, který je v souladu s předchozími experimenty.