

ABSTRAKT

Kalmodulinová proteinkinasová kaskáda je signální dráha, která se podílí na buněčné odpovědi na zvýšenou koncentraci vápenatých iontů uvnitř buňky. Ca^{2+} patří mezi sekundární posly, které zajišťují odpověď na mnoho podnětů. Většina těchto odpovědí začíná navázáním vápenatých iontů na kalmodulin, receptorový protein uvnitř buňky. Vazbou se zvyšuje afinita kalmodulinu k dalším proteinům, které jsou součástí signální kaskády. Jedním z interakčních partnerů kalmodulinu je kalcium/kalmodulin-dependentní proteinkinasa kinasa 2 (CaMKK2).

CaMKK2 je serin/treoninová proteinkinasa, která se podílí zejména na regulaci genové exprese, dále také na regulaci energetické rovnováhy. CaMKK2 se skládá z několika funkčních oblastí, z nichž nejprozkoumanější je kinasová doména (její struktura již byla vyřešena díky krystalografickým studiím). Ta se nachází v prostřední části proteinu (přibližně 298 aminokyselinových zbytků) o velikosti 588 aminokyselin. U zbytku proteinu se předpokládá, že je převážně nestrukturovaný a částečně se strukturalizuje až po navázání ligandu.

Cílem této práce bylo připravit několik expresních konstruktů lidské CaMKK2. Tyto konstrukty jsou určeny pro strukturní studie a dále také pro studium interakcí a aktivity jednotlivých proteinů. Při navrhování a přípravě expresních konstruktů se vycházelo z předpokladu, že CaMKK2 je regulována místě-specifickou fosforylací.

Výsledky této práce prokázaly, že interakce CaMKK2 s proteinem 14-3-3 je závislá na fosforylaci motivů v sekvenci CaMKK2. V rámci této práce byly připraveny čtyři konstrukty CaMKK2 lišící se v počtu a umístění fosforylačních míst specifických pro protein kinasu A. Některá z těchto míst se zároveň shodovaly s motivy typickými pro vazbu proteinu 14-3-3. Všechny konstrukty byly úspěšně exprimovány a purifikovány. Enzymová aktivita připravených proteinů byla ověřena pomocí kinetického měření. Interakce fosforylované CaMKK2 s proteinem 14-3-3 byla ověřena pomocí nativní elektroforézy a analytické ultracentrifugace.