

## Posudek školitele diplomové práce

Jméno a příjmení uchazeče/ky: Bc. Kateřina JAROSILOVÁ

Název práce: Preparation and characterization of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CaMKK2)

Hodnocení jednotlivých aspektů práce (ve standardní stupnici 1 až 4)

### 1. Samostatnost uchazeče/ky

Ve fázi zpřesňování tématu práce	1
Během zpracování zadaného tématu	1
Při sepisování práce	1

### 2. Komunikativnost, schopnost spolupráce

1

### 3. Zájem o práci a pracovní nasazení uchazeče/ky

1

Případný slovní komentář k bodům 1. až 3. :

Tématem diplomové práce Kateřiny Jarosilové byla příprava lidské Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependentní proteinkinasy kinasy 2 (CaMKK2) a jejího komplexu s proteinem 14-3-3 gamma. CaMKK2 patří mezi proteinkinasy specificky fosforylující Ser/Thr a je jednou z proteinkinás tzv. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin signální dráhy. CaMKK2 fosforyluje a tím reguluje proteinkinasy CaMK1, CaMK4 a dále také proteinkasu AMPK, která je důležitým regulátorem energetického metabolismu. Aktivita CaMKK2 je regulována fosforylací proteinkinásou A (PKA) v procesu, který zahrnuje vazbu proteinu 14-3-3. Bližší detaily a molekulární mechanismus této regulace jsou neznámé.

V rámci své diplomové práce Kateřina Jarosilová:

- připravila několika expresních konstruktů lidské CaMKK2, které se lišily počtem míst fosforylovaných PKA,
- úspěšně tyto proteiny exprimovala a vypurikovala,
- provedla optimalizaci fosforylačního protokolu (fosforylace byla sledována pomocí MS),
- otestovala interakci fosforylované CaMKK2 s proteinem 14-3-3 pomocí nativní elektroforézy a analytické ultracentrifugace,
- ověřila katalytickou aktivitu připravených proteinů.

Výsledky této práce ukázaly, že:

- rekombinantní CaMKK2 připravená expresí v bakteriích *E. coli* je již během exprese autofosforylovaná na řadě míst,
- připravené proteiny jsou katalyticky aktivní,
- pro interakci CaMKK2 s proteinem 14-3-3 je nutná fosforylace Ser100 a Ser511 prostřednictvím PKA,
- PKA fosforyluje Ser100 CaMKK 2 téměř kompletně zatímco fosforylace Ser511 je pouze částečná,
- stechiometrie komplexu 14-3-3 s CaMKK2 je s velkou pravděpodobností 2:1.

Kateřina Jarosilová se v průběhu řešení DP seznámila s metodami exprese a purifikace

rekombinantních bílkovin, nativní elektroforézy, analytické ultracentrifugace a enzymové kinetiky. Pracovala pečlivě a samostatně a o studovanou problematiku jevila značný zájem.

Stanovisko k opravě chyb v práci:

opravný lístek/oprava v textu **NENÍ** podmínkou přijetí práce

### **C. Celkový návrh**

Práci doporučuji k přijetí k dalšímu řízení: **ANO**

Navrhovaná celková klasifikace: 1

Datum vypracování posudku: 17. 5. 2017

Jméno a příjmení, podpis školitele: prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.