

Posudek oponenta

Diplomová práce Kateřiny Jarosilové „**Preparation and characterization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CaMKK2)**“

Diplomová práce Kateřiny Jarosilové je zjevně výsledkem soustředěného úsilí a vysokého pracovního nasazení a zahrnuje charakterizaci významné kinázy z hlediska jejích vlastností vazebných a konformačních. CaMKK2 je serin/treoninová proteinkinasa, která se podílí zejména na regulaci genové exprese a ovlivňuje poměrně širokou škálu buněčných procesů. Studovaná CaMKK2 je charakteristická několika funkčními oblastmi z nichž pouze kinasová doména je poměrně dobře popsána a to jak z hlediska funkčního tak strukturního. N a C koncové části vykazují známky nestrukturovanosti za normálních podmínek a jejich úloha je spíše regulační. Ke strukturovanosti dochází zřejmě až po vazbě s jinou částí proteinu nebo i s jiným proteinem.

Cílem práce byla příprava 4 expresních konstruktů lidské CaMKK2 pro potřeby strukturních studií, pro studium interakcí a aktivity jednotlivých proteinů. Předpokladem všech experimentů byla souvislost mezi místně specifickou fosforylací a regulační funkcí proteinu. Mezi další poznatky potvrzené v diplomové práci patří, že interakce CaMKK2 s proteinem 14-3-3 je závislá na fosforylaci motivů v sekvenci CaMKK2. K tomuto závěru vedly experimenty při nichž byly připraveny konstrukty CaMKK2 lišící se v počtu a umístění fosforylačních míst specifických pro PKA. 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.

Práce je psána poměrně slušnou angličtinou s malým množstvím překlepů, je přehledně členěna a obsahuje velmi detailní popis přípravy rekombinantních proteinů, jejich čištění a finální charakterizace. V úvodní části diplomové práce považuji v některých ohledech popis “Ca²⁺ signaling pathways” za možná až příliš obsáhlý a totéž lze říci i o kapitole “Signaling cascades involving CaMKK2”. Tabulky a obrázky jsou v publikační kvalitě, pouze obrázek 4.2 mohl být ve vyšším rozlišení. Na str. 54 je překlep při pojmenování jednoho z konstruktů – namísto CaMKK2³⁻⁵¹⁷ S100, S511 má být CaMKK2⁹³⁻⁵¹⁷ S100, S511. Myslím, že práce jako taková podává poměrně jasný důkaz o kvalitě předkladatelky která musela zvládnout širokou škálu laboratorních technik a dokázala připravit a charakterizovat všechny studované konstrukty. Na druhou stranu trochu postrádám více strukturně-funkčního popisu případně domodelování některých vlastností fosforylovaných proteinů. K práci mám několik otázek na které bych rád aby předkladatelka odpověděla v rámci své obhajoby.

- 1) Byl někdy experimentálně studován obsah ss v CaMKK2 na full length proteinu? Pokud ano, s jakým výsledkem? Predikce obsahu sekundárních struktur v práci nejsou příliš informativní a jdou provedeny jedinou metodou. Jak by vypadaly výsledky při použití specifického nástroje pro predikci nestrukturovaných regionů včetně číselných hodnot.
- 2) Jakým způsobem vzniká isoforma CaMKK1? Jde o přepis stejného genu jako pro CaMKK2, jak v tom případě vypadá exonová mapa? Existuje struktura kinasové domény CaMKK1?
- 3) Jaké druhy jiných kináz kromě PKA a autofosforylace se mohou případně podílet na fosforylaci CaMKK2?
- 4) CaMKK2 fosforyluje CaMKI a CaMKIV? Jak se od sebe liší tato místa fosforylace?
- 5) Jak vypadá nebo jak se dá usoudit na vazebný epitop proteinu 14-3-3 a CaMKK2? Spadá CaMKK2 do třídy sekvencí kterou 14-3-3 váže? Je možné ukázat buď spektrum nebo alignmet vazebných sekvencí 14-3-3
- 6) Jaký je nejvíce pravděpodobný význam nestrukturovaných částí CaMKK2?

Celkově práci hodnotím jako velmi kvalitní a doporučuji ji k dalšímu řízení. V případě že mi jako oponentovi přísluší parvo navrhnout klasifikaci, navrhuji výborně.

Praha 21.5.2017

RNDr. Jiří Vondrášek CSc