

## Abstrakt

Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin-dependentní proteinkinasa kinasy (CaMKK) jsou serin/threonin kinasy, které se účastní vápníkové signální dráhy, přičemž u savců byly popsány dvě isoformy CaMKK, CaMKK1 a CaMKK2. Při zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých kationtů dochází k aktivaci CaMKK prostřednictvím vazby komplexu Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin na C-koncový segment CaMKK, což uvolní autoinhibici přerušением interakcí autoinhibičního segmentu s aktivním centrem kinasy. Aktivované CaMKK následně fosforylují a aktivují proteinkinasy CaMK1 a CaMK4 a v případě CaMKK2 i AMPK.

Aktivita CaMKK je dále regulována prostřednictvím fosforylace cAMP-dependentní proteinkinasy A (PKA). Tato fosforylace vytvoří dva vazebné motivy, které jsou rozpoznány regulačními proteiny 14-3-3. Předchozí studie ukázaly, že protein 14-3-3 udržuje fosforylovanou CaMKK1 v inhibovaném stavu tím, že blokuje defosforylaci inhibičního fosforylačního místa. Předpokládá se, že i CaMKK2 by mohla být regulována podobným způsobem. Nicméně úloha vazby proteinu 14-3-3 v regulaci CaMKK2 je nejasná. Pro studium tohoto komplexu je však nutné připravit rekombinantní CaMKK2, která bude plně fosforylována na obou 14-3-3 vazebných motivech.

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo optimalizovat protokol pro fosforylaci lidské CaMKK2 (rezidua 93-517) obsahující pouze dvě fosforylační místa, Ser100 a Ser511, a následně charakterizovat komplexy CaMKK2:protein 14-3-3 $\gamma\Delta$ C a CaMKK2:CaM:protein 14-3-3 $\gamma\Delta$ C pomocí analytické ultracentrifugace.

Pro optimalizaci fosforylace CaMKK2-S100,S511 prostřednictvím PKA byla použita hmotnostní spektrometrie a phos-tag SDS-PAGE. Pomocí analytické ultracentrifugace bylo zjištěno, že se komplex CaMKK2:protein 14-3-3 tvoří se stechiometrickým poměrem 1:2 a se zdánlivou disociační konstantou v mikromolární oblasti. Pro komplex CaMKK2:CaM:protein 14-3-3 $\gamma$  byl stanoven stechiometrický poměr 1:1:2.