

UNIVERZITA KARLOVA

2. lékařská fakulta

Studijní program: Biochemie a patobiochemie



Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i.

DISERTAČNÍ PRÁCE

Strukturní studie komplexů proteinů 14-3-3

Structural studies of 14-3-3 protein complexes

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.

Praha 2019

Mgr. Aneta Šmídová

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 3. 6. 2019

ANETA ŠMÍDOVÁ

Podpis

1 Identifikační záznam

ŠMÍDOVÁ, Aneta. Strukturní studie proteinů 14-3-3.[Structural studies of 14-3-3 proteins.]
Praha, 2019. 68 stran, 5 příloh. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2.
lékařská fakulta, Fyziologický Ústav AV ČR, v. v. i. Vedoucí práce Obšilová, Veronika.

2 Poděkování

Velmi děkuji své školitelce RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D. za odborné a trpělivé vedení disertační práce, za mnoho cenných rad týkající se práce v laboratoři a všestrannou pomoc a podporu nejen při práci v laboratoři.

Dále děkuji prof. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. za pomoc a rady týkající se proteinové krystalografie a řešení struktur. Děkuji také RNDr. Olívii Petrvalské, Ph.D. za měření a zpracování výsledků analytické ultracentrifugace. Dále děkuji Ing. Olze Zimmermannové, Ph.D. z oddělení Membránového transportu z Fyziologického ústavu AV ČR v. v. i. za pomoc při experimentech prováděných *in vivo*. Chtěla bych také poděkovat prof. RNDr. Petru Heřmanovi, CSc. z Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy za měření a zpracování dat fluorescenčních metod. Děkuji také kolegům z Centra molekulární struktury BIOCEV za obsluhu robotu Crystal Gryphon při proteinové krystalizaci a měření cirkulárního dichroismu.

Ostatním svým milým kolegům oddělení Strukturní biologie signálních proteinů Fyziologického ústavu AV ČR, v. v. i. děkuji za vytvoření příjemného a přátelského pracovního prostředí.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům, prarodičům a příteli za všestrannou podporu při mém studiu.

Tato disertační práce byla realizována díky finanční podpoře:

Grantové agentury České republiky, projekt číslo 17-00726S

Grantové agentury České republiky, projekt číslo 17-01953S

3 Seznam publikací

1. ALBLOVA M, **SMIDOVA A**, DOCEKAL V, VESELY J, HERMAN P, OBSILOVA V, OBSIL T. (2017) Molecular basis of the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **114**:E9811-E9820. (IF = **9.661**)
2. KALABOVA D, **SMIDOVA A**, PETRVALSKA O, ALBLOVA M, KOSEK D, MAN P, OBSIL T, OBSILOVA V. (2017) Human procaspase-2 phosphorylation at both S139 and S164 is required for 14-3-3 binding. *Biochem Biophys Res Commun*. **493**:940-945. (IF = **2.466**)
3. **SMIDOVA A**, ALBLOVA M, KALABOVA D, PSENAKOVA K, ROSULEK M, HERMAN P, OBSIL T, OBSILOVA V. (2018) 14-3-3 protein masks the nuclear localization sequence of caspase-2. *FEBS J*. **285**:4196-4213. (IF = **4.53**)
4. ALBLOVA M, **SMIDOVA A**, KALABOVA D, LENTINI SANTO D, OBSIL T, OBSILOVA V. (2019) Allosteric activation of yeast enzyme neutral trehalase by calcium and 14-3-3 protein. *Physiol Res*. **68**:147-160. (IF = **1.324**)
5. **SMIDOVA A**, STANKOVA K, PETRVALSKA O, LAZAR J, SYCHROVA H, OBSIL T, ZIMMERMANNNOVA O, OBSILOVA V. (2019) The activity of *Saccharomyces cerevisiae* Na⁺, K⁺/H⁺ antiporter Nha1 is negatively regulated by 14-3-3 protein binding at serine 481. *Zasláno do časopisu*.

4 Obsah

1	Identifikační záznam	3
2	Poděkování	4
3	Seznam publikací	5
4	Obsah	6
5	Seznam zkratk	8
6	Úvod	10
7	Teoretický úvod	11
7.1	Proteiny 14-3-3	11
7.2	Neutrální trehalasa	13
7.3	Kaspasa-2	16
7.4	Antiporter Nha1	19
7.5	Dosud známé struktury proteinů 14-3-3	22
8	Cíle disertační práce	27
9	Metody	28
9.1	Strukturní a biochemické metody	28
9.1.1	Proteinová krystalografie	28
9.1.2	Fluorescenční měření	30
9.1.3	Maloúhlový rozptyl světla	34
9.2	Fyziologické metody	35
9.2.1	Stanovení tolerance kvasinek k solím na pevném médiu	35
9.2.2	Měření transportu a stanovení koncentrace alkalických kationtů v buňkách kvasinek	36
10	Výsledky a diskuze	37
10.1	Publikace č. 1	37
10.1.1	Úvod	37
10.1.2	Mechanismus regulace neutrální trehalasy 1 pomocí proteinu 14-3-3	37
10.1.3	Diskuze	39
10.2	Publikace č. 2	40
10.2.1	Úvod	40
10.2.2	Ověření interakce prokaspasy-2 a proteinu 14-3-3 prostřednictvím fosforylovaných Ser139 a Ser164	41
10.2.3	Diskuze	42
10.3	Publikace č. 3	42
10.3.1	Úvod	42
10.3.2	Strukturní charakterizace komplexu prokaspasy-2 a proteinu 14-3-3	43

10.3.3	Diskuze	45
10.4	Publikace č. 4	46
10.4.1	Úvod.....	46
10.4.2	Úloha proteinů 14-3-3 v regulaci kvasničného antiporteru Nha1	46
10.4.3	Diskuze	54
11	Souhrnná diskuze.....	56
12	Summary.....	57
13	Závěr	58
14	Seznam použité literatury	60
15	Seznam příloh.....	68

5 Seznam zkratek

μM	mikromolární
2D	z angl. two dimensional
Å	angström
ACD	z angl. A-crystalline domain
AUC	analytická ultracentrifugace
Bmh1 Δ C	protein Bmh1 zkrácený o nestrukurovaný C-konec
CaBD	z angl. calcium binding domain
Camkk2	z angl. calcium/calmodulin-dependent kinase kinase
CARD	z angl. caspase-recruitment domain
CD	cirkulární dichroismus
CDK1	z angl. cyclin-dependent kinase 1
CED3	z angl. cell death protein
CK2	z angl. casein kinase
CPA	z angl. cation proton antiporter
DD	z angl. death protein
DED	z angl. death effector domain
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FITC	z angl. fluorescein isothiocyanate
HSP	z angl. heat shock protein
ICE	z angl. interleukin-1 β -converting enzyme
K_D	rovnovážná disciační konstanta
kDa	kilo Dalton
MAD	multi wavelength anomalous diffraction
min	minuta
Nha	z angl. Na ⁺ K ⁺ /H ⁺ antiporter
NhaA	Na ⁺ /H ⁺ antiporter A
NHE	z angl. Na ⁺ /H ⁺ exchanger
NLS	z angl. nucleotid location sequence
nm	nanometr
NTD	z angl. N-terminus domain
OD ⁶⁰⁰	optická densita měřena při 600 nm
PKA	protein kinasa A
PEG	poly ethylen glycol
PEG 2K MME	poly (ethylene glycol) methyl ether 2000
Pma1	z angl. plasma membrane ATPase 1
proC2	prokaspasa-2
RIP1	z angl. receptor-interacting protein
s	sekunda
SAD	single- wavelength anomalous diffraction
SAXS	z angl. small angle X-ray scattering

SUC	sacharosa
SUMO	z angl. small ubiquitin-like modifier
TCEP	tris (2-carboxyethyl) phosphine
TMS	z angl. trans membrane segment
TNRF1	z angl. tumor necrosis factor receptor 1
TRADD	z angl. tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein
VDM	validoxylamin
w/v	hmotnost/objem (z angl. weight/volume)
w/w	hmotnost/hmotnost (z angl. weight/weight)
v/v	objem/objem (z angl. volume/volume)
WT	z angl. wild type

6 Úvod

Proteiny 14-3-3 jsou malé regulační biomolekuly, které jsou významné pro mnoho důležitých metabolických nebo signálních drah. Tyto konzervované proteiny byly identifikovány ve všech typech eukaryotních buněk a ovlivňují např. aktivitu a stabilitu svých vazebných partnerů, jejich buněčnou lokalizaci a interakce s dalšími proteiny. Proteiny 14-3-3 jsou předmětem výzkumu mnoha laboratoří zejména pro svoji klíčovou úlohu v regulaci mnoha biologických procesů včetně neurodegenerativních onemocnění, rakoviny a dalších patologických stavů.

Vzhledem k významnému počtu již potvrzených interakčních partnerů proteinů 14-3-3 je jejich strukturní charakterizace esenciální pro pochopení mechanismu jejich působení v rozmanitých buněčných procesech. V této práci je zkoumán mechanismus konkrétních vazebných partnerů: kvasničné neutrální trehalasy 1, lidské kaspasy-2 a kvasničného cytoplasmatického Na^+ , K^+/H^+ antiporteru Nha1.

V první publikaci vyřešena krystalová struktura komplexu neutrální trehalasy Nth1 a proteinu 14-3-3, a tak byl odhalen jedinečný mechanismus regulace Nth1. Dále byla charakterizována interakce prokaspasy-2 a proteinu 14-3-3, která odhalila způsob inhibice prokaspasy-2 proteinem 14-3-3. V posledním projektu byl potvrzen Ser481 kvasničného Na^+ , K^+/H^+ antiporteru Nha1 jako vazebné místo pro kvasničný protein 14-3-3, který tak negativně reguluje transportní aktivitu Nha1.

Výsledky této práce potvrzují rozmanité role proteinů 14-3-3 v jejich působení na širokou škálu vazebných partnerů, od kvasničných enzymů a transportérů až po důležité apoptotické proteasy.

7 Teoretický úvod

7.1 Proteiny 14-3-3

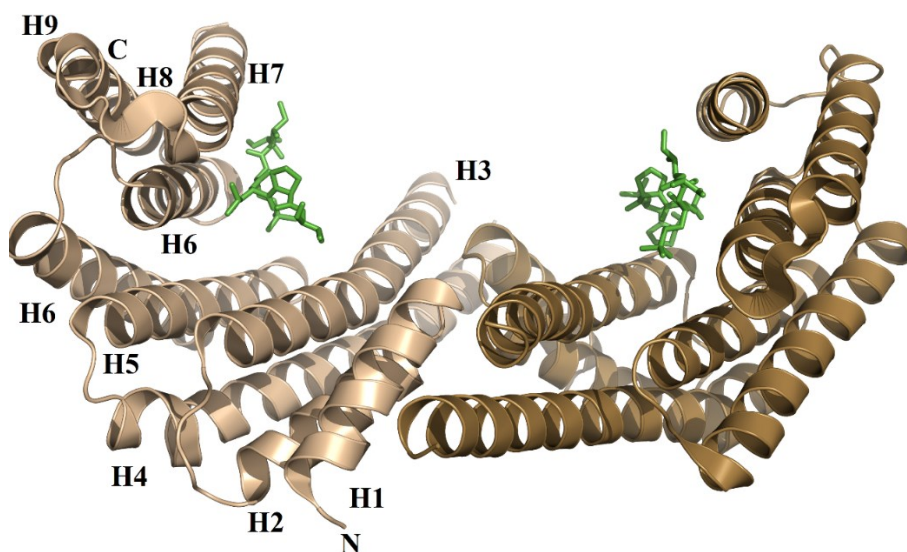
Proteiny 14-3-3 jsou rodina vysoce konzervovaných proteinů, které byly objeveny v mnoha organismech. Tyto univerzální regulátory mají důležitou roli v mnoha biochemických dějích např.: v regulaci signálních drah, regulaci transkripce, buněčného cyklu a apoptosy (Liu et al., 1995; van Hemert et al., 2001). Jsou také intenzivně studovány v kontextu vývoje neurodegenerativních a onkologických onemocnění (Berg et al., 2003; Freeman and Morrison, 2011). Svůj neobvyklý název získaly na základě výsledků analýzy proteinů v hovězím mozku, kdy během migrace na dvojdimenzionální celulosové chromatografii byly identifikovány ve 14. frakci a následně při analýze škrobovou elektroforézou se nacházely na pozicích 3.3 (Moore BW and Perez VJ, 1967).

Proteiny 14-3-3 ovlivňují své interakční partnery různými mechanismy, mezi které se řadí regulace enzymatické aktivity navázaného proteinu způsobené konformační změnou, předcházení degradace ochranou specifických strukturních nebo funkčních motivů, které často ovlivňují lokalizaci v rámci buňky. Také chrání své vazebné partnery před modifikacemi nebo interakcemi s jinými proteiny. Proteiny 14-3-3 také slouží jako „molekulové lešení“, které umožňuje vznik multiproteinových komplexů (Obsil and Obsilova, 2011). Metodami *in silico* bylo zatím odhadnuto přibližně 2000 interakčních partnerů proteinů 14-3-3, experimentálně potvrzených jich však bylo jen několik set (Johnson et al., 2010; Masone et al., 2017; Sluchanko, 2018). Pro většinu interakcí proteinů 14-3-3 s cílovým proteinem je klíčová jedna z nejčastějších postranlačních modifikací, fosforylace. Během systematické analýzy byly identifikovány tři specifické sekvenční motivy vazebných partnerů proteinů 14-3-3: RSXpSXP (motiv I), RX(Y/F)XpSXP (motiv II) a pS-X1-2-COOH (motiv III), kde X označuje jakýkoliv aminokyselinový zbytek s výjimkou cysteinu a pS fosforylovaný serinový zbytek (Yaffe et al., 1997). Proteiny 14-3-3 se také mohou asociovat s proteiny prostřednictvím elektrostatických nebo hydrofóbních interakcí, jak bylo popsáno např. u exotoxinů -S a -T u *Pseudomonas aeruginosa* (Karlberg et al., 2018) nebo u transkripčního faktoru OsFD1 (Taoka et al., 2013).

Proteiny 14-3-3 byly nalezeny ve všech eukaryotických buňkách, kde se zpravidla vyskytují v několika isoformách. U člověka bylo identifikováno celkem sedm variant proteinu 14-3-3, které se označují řeckými písmeny: β , ϵ , η , γ , τ , ζ a σ (Rosenquist, 2001; Wang and Shakes, 1996). Naproti tomu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* mají pouze dva

geny: *BMH1* a *BMH2* (z angl. *Brain Modulosignaling Homologue* (van Heusden et al., 1995).

Proteiny 14-3-3 tvoří stabilní dimery o velikosti přibližně 56 kDa (Liu et al., 1995; Xiao et al., 1995), jak je znázorněno na obrázku č. 1. Pouze savčí isoforma 14-3-3 σ upřednostňuje tvorbu homodimerů, jinak všechny známé proteiny 14-3-3 mohou vytvářet homodimery i heterodimery (Wilker et al., 2005). Každý monomer je složen z devíti antiparalelních α -helixů.



Obrázek č. 1 – Struktura dimeru proteinu 14-3-3 s navázaným ligandem (zelená) v ligand-vazebném žlábků. Jednotlivé helixy 14-3-3 jsou nadešpány H1-H9 (označeno u jednoho protomeru, převzato a upraveno z Rittinger et al., 1999).

Dimer proteinu 14-3-3 má tvar širokého písmene U, uprostřed kterého se nachází centrální vazebný kanál o rozměrech 35 Å (délka), 35 Å (šířka), 20 Å (hloubka). Tento vazebný kanál obsahuje dva amfipatické ligand-vazebné žlábků, které jsou schopny navázat současně dva různé vazebné motivy (Muslin and Xing, 2000). Strukturní uspořádání a interakce jednotlivých helixů v dimeru proteinu 14-3-3 mají za následek velkou stabilitu a rigiditu, proto strukturní změny dimeru 14-3-3 nejsou patrné ani při tvorbě komplexů s cílovými proteiny (např. Obsil et al., 2001; Sluchanko et al., 2017). Flexibilní oblast proteinů 14-3-3 představuje C-konec, který díky tomu není vidět v krystalových strukturách. Tato část funguje jako přirozený autoinhibitor a znemožňuje tak vazbu nežádoucími ligandům (Obsilova et al., 2004; Silhan et al., 2004). Naopak vysoce konzervované oblasti

se nacházejí ve vnitřním prostoru centrálního kanálu, zatímco variabilní části se nachází na povrchu proteinu (Obsilová et al., 2008).

Jak bylo už zmíněno, v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* byly identifikovány dvě isoformy proteinů 14-3-3: Bmh1 a Bmh2. Bmh1 je majoritní forma, která reprezentuje 80% všech proteinů 14-3-3, Bmh2 pokrývá zbylých 20% (van Heusden, 2009). Jejich C-konec se výrazně liší od proteinů 14-3-3 identifikovaných v buňkách vyšších organismů svou větší délkou, přítomností polyglutaminových sekvencí. Zajímavé je, že v tomto případě kvasničných proteinů 14-3-3 nezastává C-konec autoinhibiční funkci jako u lidských proteinů 14-3-3 (Veisova et al., 2010).

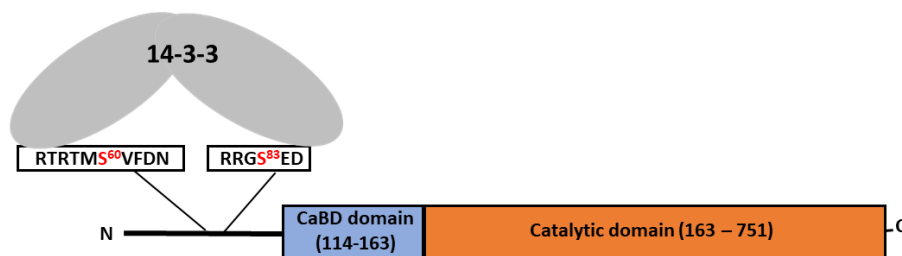
Detailní proteomická analýza identifikovala přibližně 300 interakčních partnerů proteinů 14-3-3 v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* (Kakiuchi et al., 2007), a potvrdila tak klíčovou roli proteinů 14-3-3 v mnoha signálních drahách. Mezi interakčními partnery byly nalezeny i proteiny, které regulují aktivitu cytoplasmatických transportérů např. Snf1, Hal4, Ppz1 a Ptk2 (Krauke and Sychrová, 2010). Důležitou roli proteinů 14-3-3 v kvasinkách potvrdila i studie, kde byla pozorována zvýšená intolerance kvasinek neprodukující protein Bmh1. Za běžných podmínek protein Bmh1 je silně produkován za zvýšené extracelulární koncentrace solí (Posas et al., 2000; Yoshikawa et al., 2009).

7.2 Neutrální trehalasa

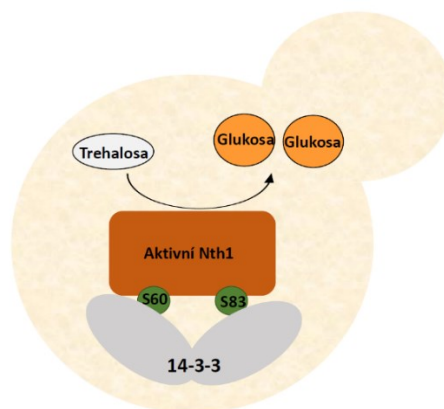
Neutrální trehalasa 1 (EC 3.2.1.28) katalyzuje hydrolýzu trehalosy (α -D-glukopyranosyl- α -D-glukopyranosidu) jak je znázorněno na obrázku č. 2. Trehalosa je neredukující disacharid, který byl objeven v mnoha organismech: např. v kvasinkách, rostlinách, houbách, u hmyzu a bezobratlých živočichů (Elbein, 1974). Při štěpení trehalosy vznikají dvě molekuly glukosy, které jsou buňkou dále využívány (obrázek č. 3). Trehalosa je klíčová pro létavý hmyz, proto potenciální inhibitory trehalasy mohou najít využití jako insekticidy (Becker et al., 1996).

Tato práce se konkrétně týká kvasničných trehalas. V kvasinkách rodu *Saccharomyces cerevisiae* byly identifikovány tři isoformy, které své názvy dostaly podle hodnoty svého pH optima; neutrální trehalasa 1 (Nth1) má pH optimum v neutrální oblasti a nachází se v cytosolu. Dále neutrální trehalasa 2 (Nth2) s pH optimem také kolem 7, která je 77% homolog Nth1 (Kopp et al., 1993; Nwaka et al., 1995). Třetí isoformou je kyselá trehalasa (Ath1) má své pH optimum v kyselé oblasti (přibližně 4,5) a nachází se ve vakuolách nebo buněčné stěně (Mittenbühler and Holzer, 1988).

Ke zvýšené expresi genu *NTH1*, a tím i k produkci Nth1 dochází v případě prudké změny teploty nebo v přítomnosti toxických látek pro kvasinky např.: H₂O₂ (zdroj oxidativního stresu), cykloheximid (inhibitor proteosyntézy) nebo CuSO₄ a NaAsO₂ (Zähringer et al., 1997). Současně s expresí genu *NTH1* je zvýšena produkce trehalosasyntasy, a tím roste i koncentrace trehalosy (Nwaka et al., 1996). Trehalosa se podílí na obranných mechanismech proti vlivu oxidativního stresu a toxických látek. Během výše popsáných zátěžových situací dochází ke zvýšené produkci glukosy štěpením trehalosy a předpokládá se, že se tímto procesem se udržuje konstantní koncentrace glukosy v cytosolu. Zároveň se přepokládá, že díky vzniklé glukose buňka přežije (Hottiger et al., 1987; Nwaka et al., 1996, 1995).

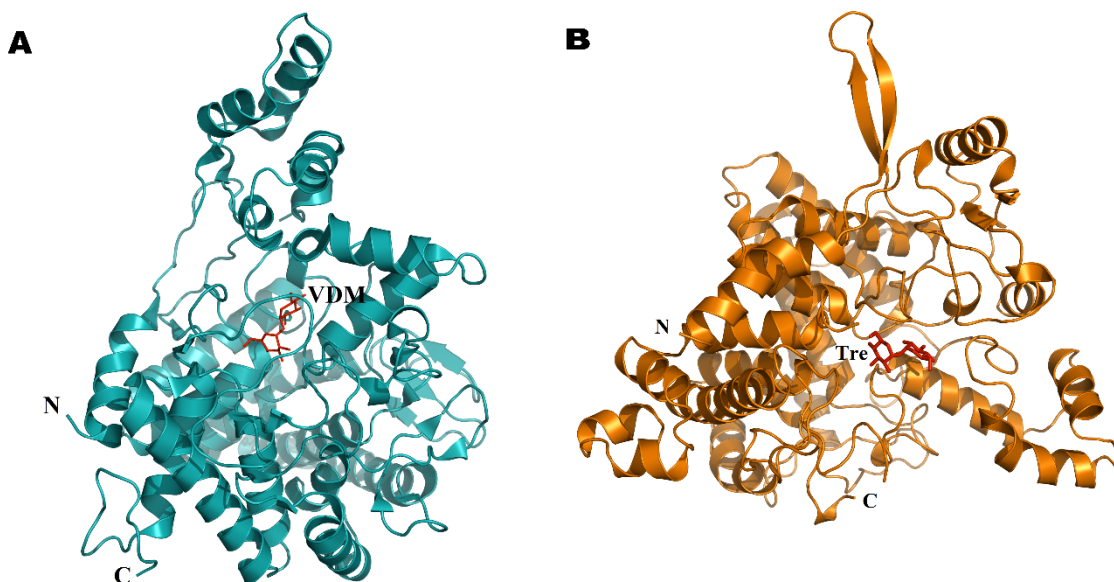


Obrázek č. 2 - Schéma primární struktury *Nth1*, kde červeně jsou označeny seriny klíčové pro interakci *Nth1* s proteinem 14-3-3, modře je vyznačena vápník-vazebná doména (CaBD), oranžově je znázorněna katalytická doména *Nth1* v C-terminální části (převzato a upraveno z Veisova et al., 2012).



Obrázek č. 3 - Schéma mechanismu regulace neutrální trehalasy 1 proteinem 14-3-3 v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*. Molekula trehalosy je štěpena komplexem aktivní formou *Nth1*, která vznikne fosforylací Ser60 a Ser83 a následnou vazbou proteinu 14-3-3 (převzato a upraveno z Kopecka et al., 2014).

Při porovnání sekvence trehalas různých organismů je patrné, že trehalasy *Saccharomyces cerevisiae* Nth1 a Nth2 a *Kluveromyces lactis* Nth1 mají podstatně delší N-konec (Nwaka and Holzer, 1998). Podle schématu primární struktury Nth1, která je znázorněna na obrázku č. 2, na N-konci kvasničných trehalas jsou umístěny vazebné motivy pro proteiny 14-3-3. V této části Nth1 byla identifikována 4 fosforylační místa (Ser20, Ser21, Ser60 a Ser83), která jsou fosforylována pomocí proteinkinasy A (PKA) (Panni et al., 2008; Veisova et al., 2012). Dalším studiem bylo potvrzeno, že pouze fosforylované Ser60 a Ser83 jsou klíčové pro interakci s proteiny 14-3-3 a tím i pro aktivaci Nth1 (Veisova et al., 2012). Dimer kvasničného proteinu 14-3-3 se váže na N-terminální konec Nth1 a pravděpodobně chrání Nth1 před degradací či defosforylací a zároveň udržuje jí v aktivovaném stavu. Předchozími studii bylo prokázáno, že Nth1 vykazuje nejvyšší aktivitu v přítomnosti vápenatých kationtů a navázaného proteinu Bmh (Veisova et al., 2012). Katalytická doména (sekvence 163-751), obsahující aktivní centrum enzymu, je napříč živočišnou říší vysoce konzervována (Amaral et al., 1997). Další důležitou součástí Nth1 je vápník vázající doména (sekvence 114-125) tzv. EF-hand motiv (Kopecka et al., 2014), který je přítomný pouze u hub. Tento motiv *helix-loop-helix* byl nalezen v mnoha rodinách proteinů a hraje důležitou roli v regulaci aktivity, kterou silně ovlivňuje vazba vápenatého kationtu. V případě Nth1 slouží ke zvýšení afinity proteinů Bmh k Nth1 (Kopecka et al., 2014; Rashidi et al., 1999).



Obrázek č. 4 - A: Stuháková reprezentace bakteriální katalytické domény trehalasy Tre37A s červeně vyznačeným inhibítozem VDM, PDB kód: 2JF4 (Gibson et al., 2007). **B:** Stuháková

reprezentace kvasničné katalytické domény trehalasy Nth1 s červeně vyznačenou molekulou trehalosy v aktivním centru enzymu, PDB kód: 5M4A (Aneta Šmídová, 2016).

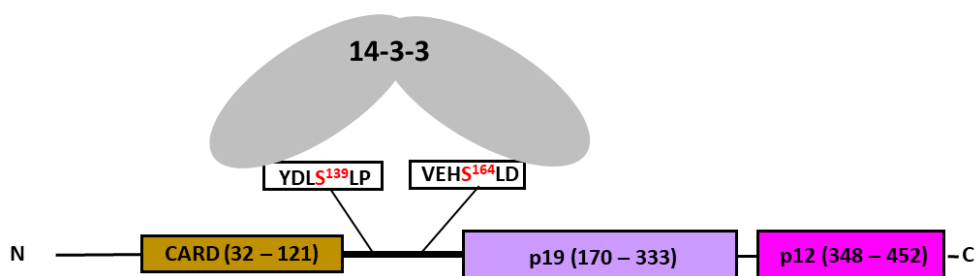
Jako první byla k dispozici struktura katalytické domény trehalasy Tre37A z bakterie *Escherichia coli* s navázaným inhibitorem validoxylaminem (VDM) v aktivním centru, která je tvořena tzv. (α/α)6 barelem, která je znázorněna na obrázek č. 4 A (Gibson et al., 2007). Stejný motiv byl nalezen i u jiných α -thoroidálních trehalas, např. u GH94 chitobiosafosforylasy (Hidaka et al., 2004), GH15 glukoamylasy (Aleshin et al., 1994), nebo GH65 maltosa-fosforylasy (Egloff et al., 2001). Všechny tyto enzymy patří do rodiny glukoamylas, které katalyzují reakce inverzí konfigurace substrátu, stejným způsobem funguje i trehalasa Tre37A. Vzhledem k publikované struktuře Tre37A lze soudit, že aktivní centrum Tre37A je pohřbené uvnitř enzymu, a proto je pro aktivaci nutná značná konformační změna (Gibson et al., 2007). Porovnání struktur katalytických domén Tre37A a Nth1 na obrázku č. 4 A, B ukazuje na drobné strukturní rozdíly, vlastní katalytické centrum tvořené již zmíněným (α/α)6 barelem. (Aneta Šmídová, 2016).

7.3 Kaspasa-2

Proteiny, které se nejvíce podílí na procesu apoptosy, jsou cysteinové proteasy: kaspasy (z *angl. cysteine aspartyl-specific protease*). Kaspasy jsou evolučně vysoce konzervované proteiny, které byly nalezeny v mnoha organismech: od hmyzu až po člověka (převzato z Li and Yuan, 2008). Od popsání kaspasy 1 jako ICE (z *angl. interleukin-1 β -converting enzyme*, Thornberry et al., 1995) a sekvenace genu CED3, který je zodpovědný za iniciaci apoptosy u hád'átka obecného (Yuan et al., 1993), bylo objeveno a popsáno deset různých lidských kaspas. Kaspasy jsou obecně děleny podle své funkce na dvě skupiny: iniciační, které zahajují proces apoptosy (kaspasy -2, -8, -9 a -10) a exekutivní, které jsou aktivovány v dalších fázích apoptosy (kaspasy -3, -6 a -7). Primární struktura iniciačních kaspas je charakterizována doménami CARD (z *angl. caspase-recruitment domain*) nebo DED (z *angl. death effector domain*), které jsou umístěny na N-konci proteinu. Efektorové kaspasy neobsahují domény CARD nebo DED a jsou primárně zodpovědné za limitovanou proteolýzu substrátů kaspas, což v důsledku vede k buněčné smrti. Největší rozdíl mezi iniciačními a efektorovými kaspasami je v přítomnosti specifických peptidů, které se nachází na N-konci efektorových kaspas a pravděpodobně zajišťující správnou lokalizaci v rámci buňky (Pop and Salvesen, 2009).

Kaspasa-2 byla jednou z prvních kaspas, která byla objevena. Byl prokázán její vliv na poškození DNA, regulaci buněčného cyklu a tlumení růstu nádorů. Kaspasa-2 je unikátní nejen tím, že se vyskytuje v jádře, ale také díky své rychlé reakci v důsledku signalizace vnějších i vnitřních faktorů během apoptosy (Kumar, 2009). Její přiřazení do skupin kaspas je spekulativní, protože její struktura je podobná iniciačním kaspasám, zatímco její substrátová specifita je bližší efektorovým kaspasám (především kaspasám -3 a -7) (Krumshabel et al., 2009; Thornberry et al., 1997).

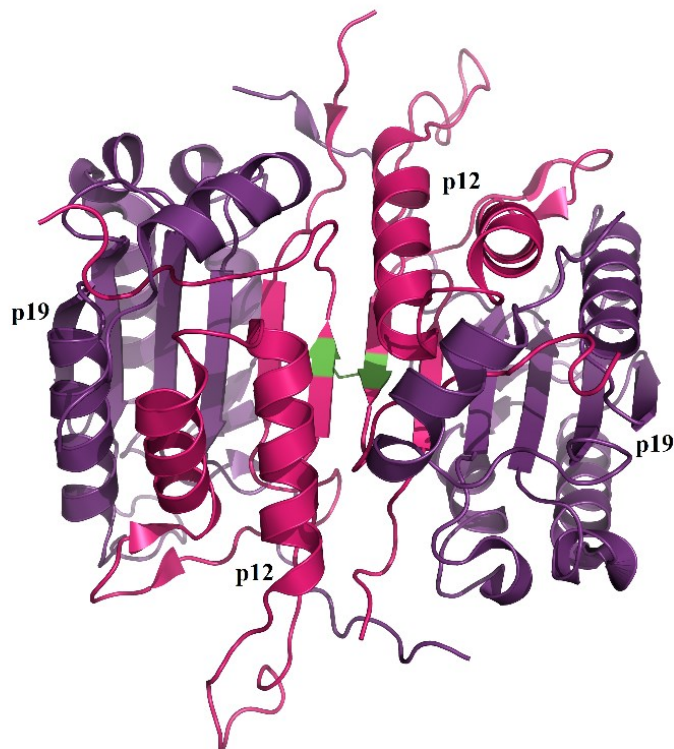
Aktivace kaspasy-2 probíhá několika způsoby. První způsob zahrnuje tvorbu multiproteinového komplexu - PIDDosomu. Tento komplex obsahuje protein p53 s doménou DD (z *angl. dead protein*) a adaptorový protein RAIDD obsahující domény CARD a DD (Tinel, 2004). Dále aktivaci kaspasy-2 ovlivňuje postranlačně několik proteinů. Jedním z nich je SUMO a enzym 9. Spojením enzymu 9 se SUMO se formuje Ubc-9. Protein SUMO se váže k doméně CARD prokaspasy-2. Ovlivňuje se tak jaderná lokalizace a následně aktivace prokaspasy-2 (Krumshabel et al., 2009). Kaspasa-2 je také aktivována na základě interakcí s proteinovými komplexy, které stimulují autokatalytické štěpení kaspasy-2. Jednou z možností je aktivace na základě signálu od TNRF1 předávaného vnější dráhou indukce apoptosy. Na základě interakce domén DED adaptorového proteinu TRADD s proteinem RIP1 dojde k interakci RIP1 s prokaspasou-2, která je v komplexu s proteinem RAIDD. Protein RAIDD a prokaspasa-2 spolu interagují prostřednictvím svých domén CARD (Duan and Dixit, 1997; Stanger et al., 1995).



Obrázek č. 5 – Schéma primární struktury prokaspasy-2, kde červeně jsou označeny seriny klíčové pro interakci prokaspasy-2 s proteinem 14-3-3, okrovou je vyznačena doména CARD, fialovou p19 a sytě růžovou p12 (vytvořeno na základě Fava et al., 2012; Tinti et al., 2014).

Aktivace prokaspasy-2, jejíž primární struktura je znázorněna na obrázku č. 5 na molekulární úrovni začíná dimerizací domény p12, a pokračuje štěpením Asp333, kdy se proenzym rozdělí na malou a velkou podjednotku, které však zůstávají asociovány. Dále

dochází k další části maturace, kdy doména CARD a sekvence spojující domény CARD a p19 jsou odstraněny štěpením Asp169 a Asp347. Další důležitou aminokyselinou pro maturaci kaspasy-2 je přítomnost Cys320 v aktivním místě. Nakonec kaspasa-2 váže adaptorovou molekulu RAIDD, oligomeruje a je zcela maturovaná (Fava et al., 2012).



Obrázek č. 6 – Stuhková reprezentace krystalové struktury maturované kaspasy-2 s zeleně vyznačeným disulfidickým můstkem, který spojuje domény p12 (sytě růžová). Fialově jsou označeny domény p19 (Schweizer et al., 2003).

Prokaspasa-2 je plně aktivována pomocí domény CARD způsobující dimerizaci. Na obrázku č. 6 je znázorněna aktivní kaspasa-2, která je tvořena heterodimerem dvou heterodimerů katalytických podjednotek p19 a p12, kde malé podjednotky p12 jsou spojeny disulfidickým můstkem. Tento disulfidický můstek je specifický pro kaspasu-2, struktury ostatních kaspas ho nemají (Schweizer et al., 2003). Katalytické místo kaspasy-2 je tvořeno žlábkem se dvěma vazebnými místy pro substrát. Kaspasa-2 rozeznává substráty s aminokyselinovou sekvencí VDEXD, nejdůležitější je pozice aspartátu na C-konci peptidu (Thornberry et al., 1997).

Aktivace kaspasy-2 je dále regulována postranlačními modifikacemi – fosforylací několika serinů, které mají za následek inhibici apoptosy (Nutt et al., 2009, 2005; Ren et al., 2012; Shin et al., 2005). U obojživelníka *Xenopus laevis* byla prokázána interakce kaspasy-

2 s proteinem 14-3-3 prostřednictvím fosforylovaného Ser135, který odpovídá Ser164 u lidské izoformy. Klíčový serin je fosforylován CaMKK2 (z angl. *calcium/calmodulin-dependent kinase kinase*) a protein 14-3-3 tedy může vytvořit komplex s prokaspasou-2, čímž dochází k inhibici aktivace apoptosy prozatím nepopsaným způsobem (Nutt et al., 2009, 2005). Další fosforylační místo identifikované u lidské prokaspasy-2 je Ser340, který se nachází ve spojovací sekvenci mezi velkou a malou katalytickou podjednotkou. Ser340 je fosforylován CDK1 (z angl. *cyclin-dependent kinase 1*). Tyto fosforylace jsou klíčové pro inhibici aktivace prokaspasy-2 a zásadní pro regulaci buněčné smrti během mitózy (Andersen et al., 2011). Třetím fosforylačním místem je Ser157, fosforylovaný proteinkinásou CK2 (z angl. *casein kinase 2*). Poslední identifikované fosforylační místo prokaspasy-2, které hraje důležitou roli v její regulaci, je Ser139, který se účastní mechanismů potlačující nádorové bujení (Ren et al., 2012). S pomocí metod strukturní bioinformatiky bylo zjištěno, že fosforylační místo Ser139 u lidské prokaspasy-2 je evolučně konzervované (Tinti et al., 2014). Tato predikce zároveň koresponduje s faktem, že interakční partneři proteinů 14-3-3 mají zpravidla dvě fosforylační místa vzdálená od sebe přibližně 20 aminokyselin (Kostecky et al., 2009; Obsil and Obsilova, 2011).

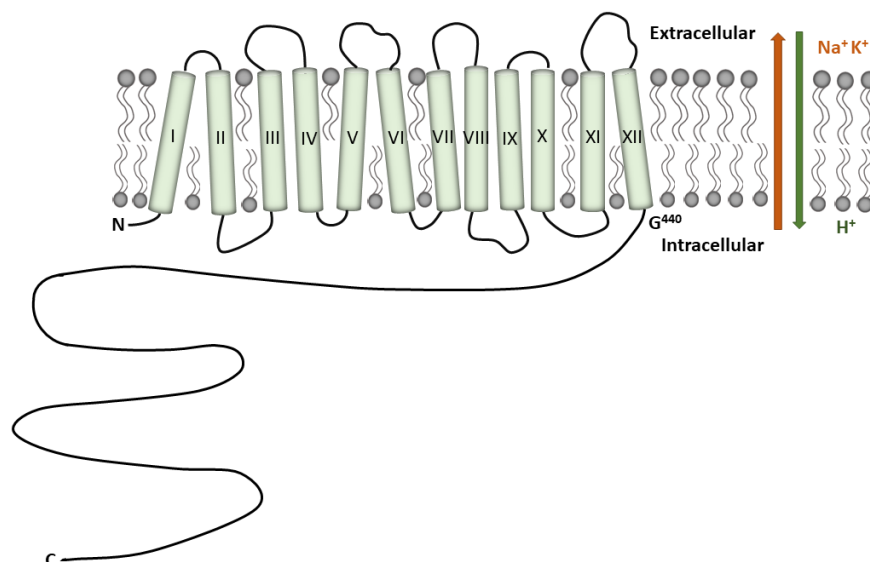
7.4 Antiporter Nha1

V biomedicínském výzkumu je studium homeostázy důležité kvůli patologickým projevům v neurodegenerativních onemocněních, poruchám metabolismu nebo v zhoubných nádorech (Donowitz et al., 2013; Shattock et al., 2015). Jako modelový systém pro studium homeostázy byly vybrány kvasinky jako dostupný eukaryotní organismus s celým sekvenovaným genomem a zároveň se schopností rychle se množit a snadnou genetickou manipulací (Goffeau et al., 1996). Jednou ze základních podmínek přežití buněk je udržování stálého vnitřního prostředí, přestože ve vnějším prostředí dochází (mimo jiné) ke změnám v koncentraci iontů a pH. Mezi nejběžnější kationty, které se v přírodě vyskytují, jsou draslík a sodík (Rodríguez-Navarro, 2000). Tyto kationty jsou i v jisté míře zastoupeny v buňkách, ovšem při vysokých koncentracích mohou být toxické až letální, nicméně jsou důležité pro správnou funkci mnoha fyziologických procesů (Rodríguez-Navarro, 2000; Serrano et al., 2007).

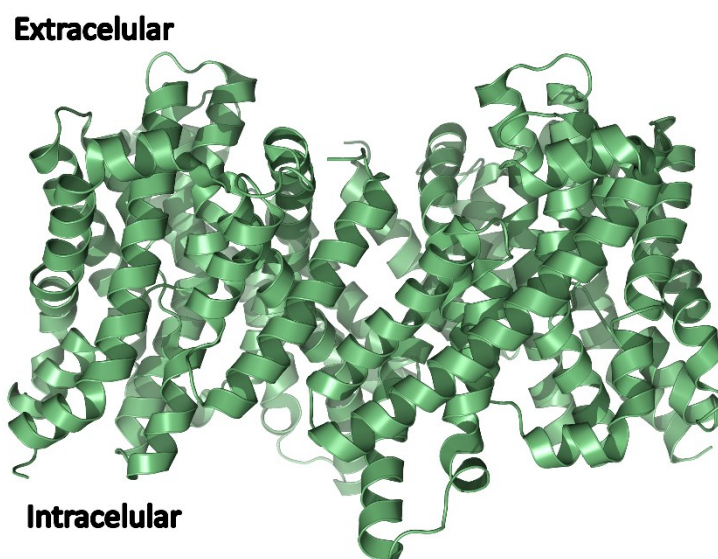
Mezi transportéry, které převážně zajišťují optimální buněčnou koncentraci kationtů a protonů (pH) v buňkách většiny organismů se řadí antiportery Na^+/H^+ (rodina exchangerů CPA/SLC9 NHE/NHA) (Brett et al., 2005; Donowitz et al., 2013). Tato rodina proteinů je

rozdělena na dvě podrodiny: exchangery NHE (Orlowski and Grinstein, 2004) a antiporterů NHA (Brett et al., 2005). V kvasinkách rodu *Saccharomyces cerevisiae* byly identifikovány 2 typy antiporterů: Nha1 byl nalezen v cytoplasmatické membráně a Nhx1p v endosomálním prevakuolárním kompartmentu (Nass and Rao, 1998). Kvasničný antiporter Nha1 využívá vnitřního gradientu protonů vytvořených H⁺-ATPázou Pma1 k aktivnímu transportu kationů alkalických kovů z buněk (Bañuelos et al., 1998; Kinclová et al., 2001). Antiporter Nha1 je důležitý pro okamžitou osmotickou stresovou odezvu, regulaci vnitřního pH a hodnotu membránového potenciálu (Kinclová-Zimmermannová and Sychrova, 2006; Prior et al., 1996).

Struktura antiporterů se skládá z krátkého hydrofilního N-konce, dvanácti transmembránových segmentů (TMS) a hydrofilního C-konce, který zasahuje do buněčné cytoplasmy, jak je znázorněno na obrázku č. 7. Membránové domény antiporterů jsou vysoce konzervované a jsou zodpovědné za iontovou výměnu (Hendus-Altenburger et al., 2014; Kinclová et al., 2001, Paulino et al., 2014; Wöhlert et al., 2014). Krystalová struktura proteinů z rodiny CPA byla vyřešena pro bakteriální isoformu NhaA z *Escherichia coli* (Hunte et al., 2005) a *Thermus thermophilus* NapA (Lee et al., 2013), dále pro NhaP1 z *Methanocaldococcus jannaschii* (Paulino et al., 2014) a NhaP1 z *Pyrococcus abyssi*, obrázek č. 8 Wöhlert et al., 2014). Všechny publikované struktury postrádají variabilní C-koncové hydrofilní části, které jsou charakteristické absencí sekundární i terciální struktury. Struktura a funkce transmembránové domény NhaA byla studována kombinací metod 2D kryoelektronové mikroskopie a proteinové krystalizace. Periplasmatický povrch je rigidní kvůli helixům, které těsně interagují s lipidovou dvojvrstvou membrány. Mezi TMS jsou krátké hydrofilní smyčky, které prochází do cytoplasmy (Hunte et al., 2005). Další výzkum potvrdil dimerizaci antiporteru NhaA a zároveň byly identifikovány dvě beta vlásenky u monomeru, které formují anti-paralelní beta skládaný list v periplasmické části dimeru, konkrétně aminokyselinové zbytky mezi Pro45 a Asp58 (Rimon et al., 2007). Interakce dvou beta-vlásenek a následný vznik antiparalelního beta-skládaného listu je typický případ oligomerizace proteinů v cytoplasmě (Maris et al., 2005).



Obrázek č. 7 – Schéma kvasničného antiporteru *Nha1*. Šedozeleně jsou vyznačeny jednotlivé TMS procházející cytoplasmatickou membránou (převzato a upraveno z Kinclová et al., 2001).



Obrázek č. 8 – Stuhková reprezentace krystalové struktury antiporteru *Pyrococcus abyssii* *NhaP1* při pH 8, PDB kód: 4CZ8 (Wöhlert et al., 2014).

Krystalové struktury bakteriálního antiporteru poskytly informace o vazebném místě pro sodný kation, který se nachází na TMS 4 a 9, v těsné blízkosti cytoplasmatické membrány (Hunte et al., 2005). Vazebné místo obsahuje nejvíce konzervované aminokyselinové

zbytky: Asp163, Asp164, Asp133 a aminokyseliny klíčové pro transport kationtu: Thr132, Asp163 a Asp164 (Galili et al., 2004, 2002). Na druhou stranu cytoplazmatické C-konce antiporterů mají v různých organismech různou sekvenci aminokyselin (Kamauchi et al., 2002; Pribylová et al., 2006) a mají regulační funkci (Kinclová et al., 2001; Simón et al., 2003).

Porovnání hydrofilních C-konců antiporteru Nha1 z různých druhů kvasinek ukázalo, že *Saccharomyces cerevisiae* Nha1 má výrazně delší C-konec, který představuje přibližně 56% celé délky proteinu. Krátký hydrofilní N-konec a transmembránová část proteinu je z 60% identická s antiportery *Zygosaccharomyces rouxii* a *Candida albicans* (Prior et al., 1996; Soong et al., 2000). I když jsou kvasničné antiportery Nha1 jsou vysoce homologní, jejich substrátová specifita se liší. *Saccharomyces cerevisiae* Nha1 transportuje jako jediný z kvasničných isoformů kromě sodíku a lithia navíc i draslík. Buňky rostlin i vyšších savců netransportují jiné kationty než sodík a lithium (Kinclová et al., 2001). Experimentálně bylo potvrzeno, že zkrácení nestrukturovaného C-konce nemá vliv na umístění proteinu v cytoplasmatické membráně, tvorbu správné konformace, na transportní aktivitu a substrátovou specifitu. Po zkrácení C-konce proteinu Nha1 o téměř 90%, je antiporter stále plně aktivní v transportu všech substrátů, dokonce dochází ke zvýšené toleranci k solím s výjimkou lithia. V tomto případě jsou kvasinky citlivé na zvýšenou koncentraci iontů. Část C-konce antiporteru (sekvence 915-945) hraje důležitou roli v regulaci, pravděpodobně vlivem posttranslačních modifikací (Kinclová et al., 2001). Hog1p je jedinou potvrzenou kinasou, která ovlivňuje antiporter Nha1 fosforylací na pozicích Thr765 a Thr876 tím i reguluje aktivitu antiporteru Nha1 (Kinclova-Zimmermannova and Sychrova, 2006), avšak pozdější studie nepotvrdila úlohu této kinasy v interakci Nha1 a proteinů Bmh (Zahrádka et al., 2012). V roce 2012 byla potvrzena interakce mezi proteiny Bmh a antiporterem Nha1, byla identifikována potenciální místa interakce a to na nestrukturovaném C-konci. Jedno z velmi pravděpodobných míst interakce je Ser472 (Zahrádka et al., 2012).

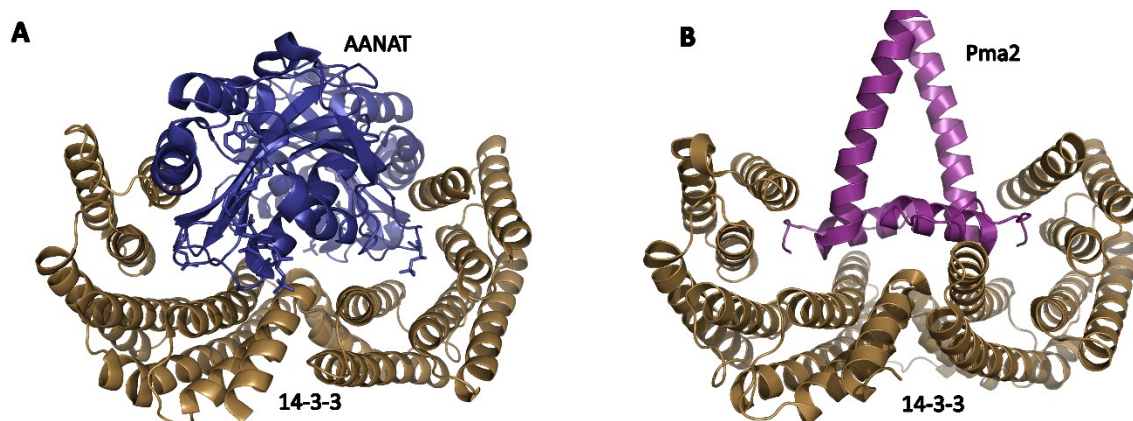
7.5 Dosud známé struktury proteinů 14-3-3

Přestože proteiny 14-3-3 mají v buňkách velmi rozmanité role a jsou dlouhou dobu studovány, je dodnes k dispozici jen šest krystalových struktur proteinů 14-3-3 v komplexu se svým vazebným partnerem nebo jeho významnou částí. Omezený počet vyřešených struktur proteinových komplexů proteinů 14-3-3 je nestrukturovanost interakčních partnerů proteinů 14-3-3, především sekvencí, které obsahují vazebné motivy. Přestože v této

kapitole jsou představeny funkčně i strukturně velmi rozdílní vazební partneři proteinů 14-3-3, ze získaných strukturních dat je patrné, že proteiny 14-3-3 jsou velmi rigidní makromolekuly a po vazbě na ostatní proteiny nevykazují výrazné konformační změny.

Jako první byla publikována struktura proteinu 14-3-3 s enzymem serotonin-N-acetyltransferasou (AANAT), která se podílí na regulaci syntézy melatoninu během dne (obrázek č. 9 A). AANAT katalyzuje přesun acetylu z acetylkoenzymu A na serotonin za vzniku acetylserotoninu, který je prekurzorem melatoninu. Výsledky strukturní studie potvrdily, že každý monomer proteinu 14-3-3 interaguje s molekulou AANAT prostřednictvím dvou fosforylačních míst. Molekuly AANAT jsou navázané uprostřed ligand-vazebného žlábků 14-3-3, kde vytváří širokou síť interakcí. Interakce AANAT se 14-3-3 způsobuje konformační změnu, která umožňuje navázání acetyl-koenzymu A a serotoninu (Obsil et al., 2001). Protein 14-3-3 způsobuje rapidní změnu struktury AANAT, a tím i změnu afinity substrátu k enzymu (Obsil and Obsilova, 2011).

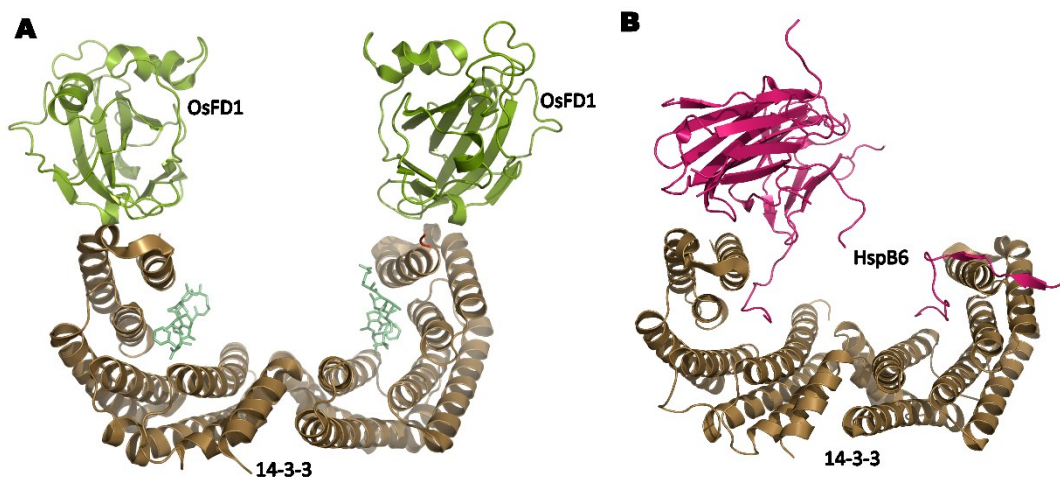
Další dostupnou strukturou proteinů 14-3-3 s navázaným vazebným partnerem je komplex proteinu 14-3-3 s C-terminální částí Pma2, která se řadí do rodiny H^+ -ATPas (obrázek č. 9 B). Tato rodina transmembránových proteinů zajišťuje protonový gradient, který je hnací silou pro příjem živin a zajištění buněčného tlaku. C-koncová část Pma2 zajišťuje autoregulaci aktivity prostřednictvím interakce s proteiny 14-3-3. Pomocí proteinové krystalografie a kryoelektronové mikroskopie bylo potvrzeno, že dimer proteinu 14-3-3 interaguje s dvěma vazebnými motivy obsahující fosforylovaný Ser938 v C-koncové oblasti Pma2. Získaná strukturní data v kombinaci s měřením aktivity odhalily mechanismus aktivace Pma2: proteiny 14-3-3 interagují prostřednictvím fosforylovaného Ser938, kdy dochází k tvorbě hexameru Pma2 v plasmatické membráně a tím i k plné aktivaci tohoto transportéru (Ottmann et al., 2007).



Obrázek č. 9 – A: Stučková reprezentace krystalové struktury komplexu AANAT:14-3-3 ζ (PDB kód: 1IB1), kdy protein 14-3-3 je znázorněn hnědou, modře je vyznačen dimer AANAT (Obsil et al., 2001). **B:** Stučková reprezentace krystalové struktury komplexu Pma2:14-3-3(PDB kód: 2O98). Protein 14-3-3 je vyznačen hnědou, Pma2 je vyznačena fialově (Ottmann et al., 2007).

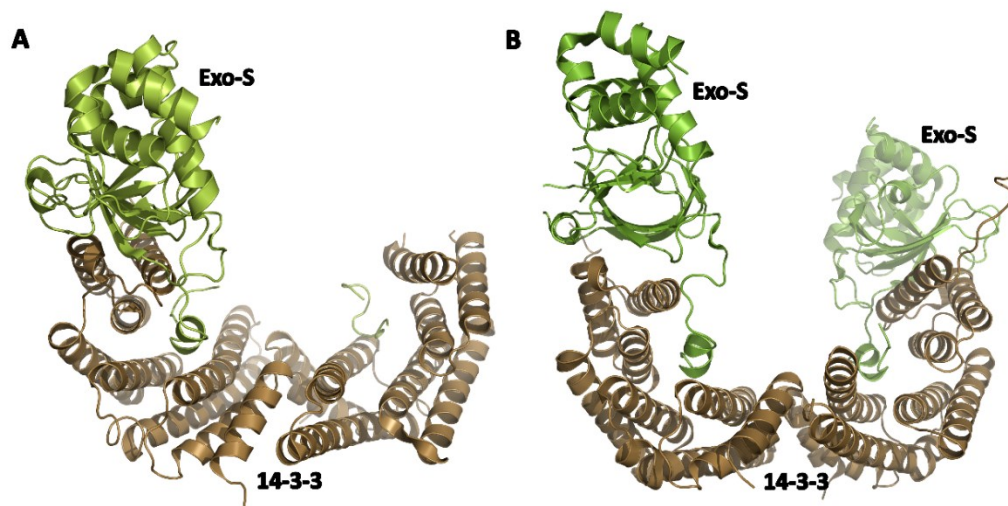
Další krystalová struktura proteinu 14-3-3 s vazebným partnerem byla publikována v roce 2011. Interakčním partnerem je florigen, který je univerzální rostlinný hormon důležitý pro kvetení. Pro objasnění mechanismu působení tohoto proteinového hormonu byla vyřešena krystalová struktura florigenu Hd3a s proteinem 14-3-3 (obrázek č. 10 A). Výzkum potvrdil úlohu proteinů 14-3-3 jako intracelulárních receptorů pro florigen, kdy dochází k současnému navázání florigenu Hd3a nezávisle na fosforylaci na méně konzervované části proteinu 14-3-3 a zároveň transkripčního faktoru OsFD1 do vazebného žlábků prostřednictvím fosforylace Ser192 (Taoka et al., 2011). Tvorba ternárního komplexu 14-3-3:Hd3a:OsFD1 je klíčová pro iniciaci vzniku květů u rýže (Taoka et al., 2013).

V roce 2017 byla publikována další struktura proteinů 14-3-3 v komplexu s interakčním partnerem HSPB6 (HSP70), který se řadí do rodiny HSP (z angl. *small heat shock proteins*) (obrázek 10 B). Tato velká rodina proteinů zajišťuje univerzální odpověď buněk na stresové situace: vysoká teplota, extrémní hodnoty pH nebo přítomnosti těžkých kovů (Mymrikov et al., 2011). Interakce proteinů 14-3-3 s HSP70 hraje důležitou roli v několika patologických procesech: relaxace měkkých tkání, subarachnoidální krvácení, astma nebo vysoký krevní tlak. Na základě struktury komplexu bylo potvrzeno, že HSPB6 interaguje s proteinem 14-3-3 pomocí fosforylace na Ser16, který se nachází v nestrukturované oblasti na N-konci (NTD). Strukturovaná část HSPB6 ACD (z angl. *A-crystalline domain*) je dimerní. Proteiny 14-3-3 interagují s ACD prostřednictvím C-terminálních α -helixů, kdy vzniká antiparalelní motiv s beta-listy ACD. Prvním krokem vzniku komplexu HSPB6:14-3-3 je pravděpodobně interakce motivu s fosforylovaným Ser16, která má za následek zapojení i druhého vazebného žlábků proteinu 14-3-3. Na základě těchto silných interakcí dochází k blokování proteinů 14-3-3 pro vazbu jiných proteinů (Sluchanko et al., 2017).



Obrázek č. 10 – **A:** Stuhková reprezentace krystalové struktury komplexu proteinu 14-3-3 (hnědá) a florigenu (světle zelená) s navázaným peptidem transkripčního faktoru OsFD1 (tmavě zelená), PDB kód: 3AXY, (Taoka et al., 2013). **B:** Stuhková reprezentace krystalové struktury komplexu proteinu 14-3-3 (hnědá) a heatshock proteinu HSPB6 (sytě růžová), PDB kód: 5LTW (Sluchanko et al., 2017).

Další krystalovou strukturou je komplex proteinu 14-3-3 a exotoxinem Exo-S a Exo-T z *Pseudomonas aeruginosa* (obrázek č. 11). Infekce oslabených osob touto bakterií má za následek závažná onemocnění např. pneumonii. Důsledkem resistance na antibiotika je poměrně silné rozšíření ve vzduchotechnice nemocničních zařízení. Předchozí výzkum i nedávno publikované krystalové struktury obou ADP-ribosyltransferázových (ART) domén exotoxinů potvrzují, že interakce mezi proteiny je zajištěna pomocí tzv. LDLA-boxu (sekvence L⁴²⁶DLA⁴²⁹) umístěného v ligand-vazebném žlábků proteinů 14-3-3. Pomocí rozsáhlé sítě hydrofóbních a nescifických interakcí proteiny 14-3-3 zajišťují ochranu proti agregaci během sekrece toxinů do buněk, v tomto případě není interakční partner proteinů 14-3-3 fosforylován. Interakce je uskutečněna prostřednictvím méně konzervovaných oblastí proteinů 14-3-3. V tomto případě byly získány struktury dimeru proteinu 14-3-3 a jedné molekuly Exo-S (resp. Exo-T, obrázek č. 11 A) a dimeru proteinu 14-3-3 a dvou molekul Exo-S (resp. Exo-T, obrázek č. 11 B), na obrázku č. 11 jsou pouze struktury s navázaným Exo-S (Karlberg et al., 2018).



Obrázek č. 11 – **A:** Stuhková reprezentace dimeru proteinu 14-3-3 (hnědá) a jedné molekuly Exo-S (zelená), PDB kód: 6GN0. **B:** Stuhková reprezentace dimeru proteinu 14-3-3 (hnědá) a dvou molekul Exo-S (zelená), PDB kód: 6GN8 (Karlberg et al., 2018).

Poslední vyřešená krystalová struktura komplexu proteinu 14-3-3 a neutrální trehalasy Nth1 je představena v této disertační práci.

8 Cíle disertační práce

Hlavním cílem předkládané disertační práce bylo studium mechanismu regulace různých vazebných partnerů proteinů 14-3-3: kvasničná neutrální trehalasa 1 (Nth1), lidská prokaspasa-2 a kvasničný antiporter Nha1. Při výzkumu byly použity metody pro strukturní charakterizaci proteinů (proteinových komplexů) metody fluorescenční spektroskopie, proteinová krystalizace, analytická ultracentrifugace (AUC), malouhlový rozptyl světla (SAXS) a cirkulárního dichroismu (CD).

1. Objasnění mechanismu regulace kvasničné neutrální trehalasy 1 (Nth1) prostřednictvím proteinů 14-3-3

- Krystalizace fosforylované formy Nth1 WT v komplexu s kvasničným proteinem 14-3-3

2. Biofyzikální a strukturní charakterizace komplexu prokaspasy-2 (proC2) a proteinu 14-3-3

- Potvrzení tvorby komplexu proC2¹²³⁻⁴⁵¹ obsahující fosforylované Ser139 a Ser164 a určení stechiometrie komplexu pomocí analytické ultracentrifugace (AUC)
- Příprava pěti tryptofanových (Trp) mutantních forem proC2 pro následná fluorescenční měření: časově rozlišené dohasínání intenzity a anisotropie Trp fluorescence, zhášení Trp fluorescence akrylamidem
- Stanovení strukturních změn v jednotlivých oblastech proC2 indukované vazbou proteinu 14-3-3 samotné a v komplexu s proteinem 14-3-3

3. Identifikace vazebných míst intracelulárního C-konce antiporteru Nha1 a vliv kvasničného proteinu 14-3-3 na jeho aktivitu

- Příprava série mutantních forem Nha1 WT pro *in vivo* stanovení tolerance k alkalickým solím na pevném médiu a měření transportu a stanovení koncentrace alkalických kationtů v buňkách kvasinek
- Určení afinity Nha1 syntetických peptidů obsahující jednotlivé fosforylované seriny k proteinům Bmh1 a Bmh2 a následná krystalizace proteinu Bmh1 s peptidem Nha1 vykazující nejvyšší afinitu
- Příprava konstruktů Nha1⁴⁴⁰⁻⁵⁹⁶ a jeho následná biofyzikální charakterizace (samotného i v komplexu s Bmh2) pomocí metod AUC, SAXS a CD.

9 Metody

9.1 Strukturní a biochemické metody

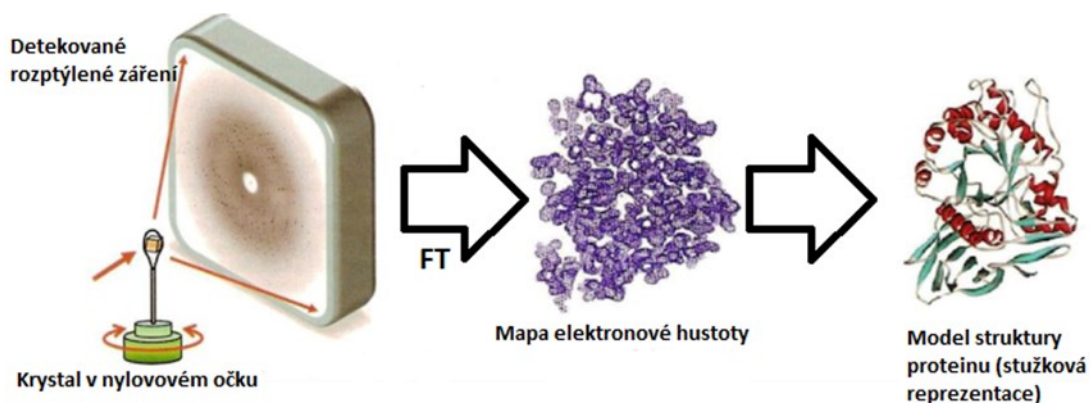
Pro strukturní charakterizaci studovaných proteinů a jejich komplexů s proteiny 14-3-3 byla použita široká škála metod strukturní biologie. Metody, kterými byla získána klíčová data pro publikace, jsou proteinová krystalizace, kombinace metod využívající jevu fluorescence (časově rozlišené dohasínání intenzity fluorescence, časově rozlišené dohasínání anisotropie fluorescence, zhášení fluorescence akrylamidem a fluorescenční polarizační esej) a malouhlový rozptyl světla. Měření byla provedena na oddělení Strukturní biologie signálních proteinů na Fyziologickém ústavu AV ČR v. v. i. (detašované pracoviště BIOCEV) nebo na specializovaných pracovištích.

9.1.1 Proteinová krystalografie

Proteinová krystalografie je jedna z biofyzikálních metod, která umožňuje určení struktury biomolekul s vysokým rozlišením. Vysoké rozlišení získaných struktur poskytuje informace o vzájemných interakcích mezi jednotlivými aminokyselinovými zbytky, proto lze objasnit reakční mechanismus enzymu nebo navrhnout inhibitor enzymu jako potenciální léčivo. Krystalizace proteinu je zásadním krokem k úspěšnému vyřešení proteinové struktury. Dále významný podíl na úspěšné krystalizaci nesou různé faktory: pH rozpouštědla, teplota, koncentrace proteinu atp. Problémy s krystalizací proteinu mohou nastat v případě, kdy protein obsahuje flexibilní části nebo nízká čistota roztoku proteinu (Guss, 2011).

Postupně bylo vyvinuto několik technik pro přípravu krystalů proteinů, všechny zahrnují působení srážecích činidel: solí, vyšších alkoholů (PEG, glycerol) nebo iontů těžkých kovů. Pro získání krystalů bylo vyvinuto několik metod: metoda visící kapky, metoda sedící kapky, metoda krystalizace pod vrstvou oleje, mikrodialýza a metoda volné difuze (Guss, 2011).

Proteinové krystaly jsou jako jiné organické molekuly citlivé na rentgenové záření, a proto musí být během sběru difrakčních dat chráněné proti rentgenovému záření. Za tímto účelem je proteinový krystal chráněn roztokem kryoprotektantu (glycerol, PEG) a zamrazen v tekutém dusíku (Guss, 2011).



Obrázek č. 12 - Schéma difrakčního pokusu (převzato a upraveno z Guss, 2011)

Difrakční měření se provádí za využití rentgenového záření, které dopadá na krystal (obrázek č. 12). Krystalem se během sběru dat otáčí, zároveň je ochlazován parami dusíku, aby nedocházelo k poškození. Paprsky rentgenového záření jsou rozptýleny na krystalech proteinu, a následně jsou zachytávány detektorem. Získaná data (obsahující amplitudy i fáze) jsou následně integrována a pomocí inverzní Fourierovy transformace je vypočítána mapa elektronových hustot. Zatímco amplitudy (druhá odmocnina intenzity rozptýleného záření) jsou získány přímo difrakčním experimentem, fáze rozptýlené vlny nemůže být měřena přímo, vzniká fázový problém. Pro odstranění fázového problému bylo vyvinuto několik způsobů řešení. V současné době velmi používaným způsobem je molekulární nahrazení, kdy chybějící fázovou informaci získáme ze známé krystalové struktury jiného proteinu, který musí vykazovat vysokou sekvenční homologii. Dále jsou k dispozici metody anomálního rozptylu (MAD/SAD z *angl. Multi-/Single- wavelength anomalous diffraction*), kdy dochází k rozptylu na těžkých atomech, z čehož lze určit jejich poloha a následně odečíst fázová informace o struktuře. Další metody jsou založeny na izomorfním nahrazení (MIR/SIR z *angl. Multi-/Single- isomorphous replacement*): kdy jsou měřeny difrakce krystalů proteinu, které byly inkubovány v roztoku obsahující těžké kovy, porovnáním difrakce krystalů s navázanými těžkými kovy a krystaly bez kovů lze získat fázovou strukturní informaci (Guss, 2011).

Pro získání krystalů komplexu Nth1WT:Bhm1ΔC byly připraveny oba proteiny v dostatečném množství a žádoucí čistotě. Krystalizace komplexu probíhala pomocí metody visící kapky, kdy byl smíchán komplex Nth1WT:Bmh1ΔC (molární poměr 1:2) s krystalizačními podmínkami komerčních kitů: Midas, Morpheus, Crystal screen 1+2, JCSG III, Index a Pentaerythritol HTS a to v poměru 1:2. Krystaly vhodné k difrakčním

testům byly získány v roztoku obsahující 200 mM octan vápenatý, 100 mM kakodylát sodný (pH 6,5), 18% (w/v) PEG 8000 a 12% (w/w) sacharosu. Krystaly byly zamrazeny a následně měřeny v přítomnosti 30% (w/v) roztoku glycerolu. Data s dostatečným rozlišením byla naměřena prof. RNDr. Tomášem Obšilem, Ph.D. a RNDr. Veronikou Obšilovou, Ph.D. na synchrotronu BESSY v Berlíně. Struktura komplexu byla vyřešena prof. RNDr. Tomášem Obšilem, Ph.D. Detailnější popis přípravy krystalů a následné zpracování dat je popsáno v publikaci č. 1.

Protein Bmh1 Δ C a syntetický peptid antiporteru Nha1 obsahující fosforylovaný Ser481 (sekvence AGRSFpS481LHRM) byly smíchány v molárním poměru 1:2 v pufru o složení: 20 mM HEPES (pH 7,0), 2 mM MgCl₂ and 2 mM TCEP. Pro krystalizaci byla i v tomto případě použita metoda visící kapky, kdy směs proteinu a peptidu o koncentraci 16 mg/ml byla přidána do krystalizační podmínky obsahující 150 mM KBr a 30% (w/v) PEG 2K MME. Tato podmínka byla vybrána jako nejvhodnější po krystalizačním screenu komerčních kitů: JCSG+, Crystal screen 1+2, Index (obsahující vítěznou podmínku), Morpheus, PEG screen PACT a XP Jena. Krystaly vhodné pro měření difrakčních dat byly zamrazeny do tekutého dusíku v přítomnosti 30% (v/v) PEG 400. Sběr difrakčních dat proběhl opět na synchrotronu BESSY v Berlíně prof. RNDr. Tomášem Obšilem, Ph.D. a RNDr. Veronikou Obšilovou, Ph.D. K řešení krystalové struktury byly použity softwary: XDS and XDSAPP, pro řešení fázového problému byla použita metoda molekulárního nahrazení funkcí MOLREP pomocí krystalové struktury komplexu Nth1 WT:Bmh1 Δ C, (PDB kód: 5N6N) a rafinována s rozlišením 2.9 Å pomocí programů COOT a PHENIX a vložen do PDB (z *angl. Protein Data Bank*) pod kódem 6QK8. Celý proces řešení struktury a její finalizace byly provedeny ve spolupráci s RNDr. Veronikou Obšilovou, Ph.D. Detailnější popis přípravy krystalů a řešení struktury je popsán v publikaci č. 4.

9.1.2 Fluorescenční měření

Celková fluorescence proteinů je dána souhrnem fluorescencí všech fluoroforů obsažených v molekule proteinu. Aromatické aminokyseliny tryptofan (Trp), fenylalanin (Phe) a tyrosin (Tyr) jsou dominantní fluorofory v proteinech. Nejsilnější intenzitu fluorescence lze pozorovat u tryptofanu, proto se jich využívá ke strukturálním studiím proteinů a studiím jejich konformačních změn. Cílená mutageneze umožňuje připravit mutantní formy proteinů, které obsahují uměle zavedené tryptofany (Albrecht, 2008). U takovýchto mutantních proteinů je vhodné různými metodami (např. diferenční skenovací

fluorimetrií, Niesen et al., 2007) zjistit, zda mutací nedošlo k zásadním strukturním změnám v molekule proteinu.

Maximální absorpce tryptofanu je pozorována u vlnové délky dopadajícího záření $\lambda = 280$ nm. Emise takto excitovaného tryptofanu se pak projeví zářením v oblasti vlnových délek od 300 do 350 nm, v závislosti na okolním prostředí (Albrecht, 2008).

9.1.2.1 Časově rozlišené dohasínání intenzity fluorescence

Časově rozlišené dohasínání fluorescence tryptofanu obsaženého v molekule proteinu je užitečným nástrojem ke zjišťování charakteru jeho mikrookolí. Dohasínání fluorescence tryptofanu je dáno hodnotou střední doby života excitovaného stavu τ_{mean} (z *angl. mean - střední*). Tato metoda poskytuje informace o dynamice molekul a jejich vzájemné interakci. Střední doba života excitovaného stavu fluoroforu τ_{mean} je definována jako čas mezi excitací a emisí světla při návratu fluoroforu do jeho základního elektronového stavu.

Dohasínání intenzity fluorescence lze popsat rovnicí č. 1 jako exponenciální pokles intenzity fluorescence v závislosti na střední době života:

$$I = I_0 e^{-\frac{t}{\tau_{mean}}}, \quad (\text{rovnice č. 1})$$

kde I je intenzita fluorescence, I_0 je počáteční intenzita fluorescence a t je čas.

Pro charakterizaci proC2 v apo formě a v komplexu s proteinem 14-3-3 bylo připraveno celkem pět tryptofanových mutantů (Trp151, Trp188, Trp218, Trp385 a Trp426) a protein 14-3-3 ξ bez přirozeně se vyskytujících tryptofanů (14-3-3 ξ W59F a W228F, (Obsilova et al., 2004)), které poskytly informace o změnách v mikrookolí jednotlivých tryptofanů po tvorbě komplexu.

Vzorky pro časově rozlišené měření dohasínání fluorescence jednotlivých tryptofanových mutantů proC2 byly měřeny a vyhodnocovány ve spolupráci s prof. RNDr. Petrem Heřmanem, CSc. z MFF UK. Detailnější popis přípravy vzorků je popsán v publikaci č. 3.

9.1.2.2 Časově rozlišené dohasínání anisotropie fluorescence

Anisotropie fluorescence je jev, kdy světlo emitované fluoroforem má při různých orientacích fluoroforu různou intenzitu. Veličina nazvaná jako anisotropie r (nestejnorodost) popisuje úroveň polarizace emitovaného záření. Její pokles závisí na rychlosti pohybu

tryptofanu (rychlosti rotace molekuly), kterou charakterizuje rotační korelační čas $\phi(s)$. Čím je rychlost pohybů fluoroforu větší (tj. v případě malých rotačních korelačních časů ϕ , tím rychleji se zmenšuje polarizace daného záření a my pozorujeme menší anizotropii r . Pomocí korelačního času a doby života excitovaného stavu τ_0 je anizotropie r definována Perrinovou rovnicí (rovnice č. 2):

$$r = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau_0}{\phi}}, \quad (\text{rovnice č. 2})$$

Během měření je zaznamenána intenzita I fluorescence ve dvou orientacích: I_{\parallel} rovnoběžná s orientací absorbovaného záření a I_{\perp} je kolmá na první orientaci.

Hodnotu anizotropie r lze pak určit podle rovnice č. 3:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}, \quad (\text{rovnice č. 3})$$

Pro molekuly vykonávající v jednom okamžiku více druhů pohybů najednou je celková anizotropie vyjádřena jako součet (rovnice č. 4) jednotlivých příspěvků anizotropií.

$$r(t) = \sum_i \beta_i e^{-\frac{t}{\phi_i}}, \quad (\text{rovnice č. 4})$$

kde β_i představují amplitudy popisující distribuci rotačních korelačních časů ϕ_i a jejich součtem je vnitřní anizotropie v čase $t = 0$ s. Amplitudy lze získat metodou maximální entropie SVD-MEM (Vecer and Herman, 2011).

Za účelem měření byly použity totožné mutantní formy proC2 a proteinů 14-3-3 zmíněné v kapitole 9.1.2.1. Vzorky pro časově rozlišené měření dohasínání anizotropie fluorescence tryptofanů byly měřeny a vyhodnoceny ve spolupráci s prof. RNDr. Petrem Heřmanem, CSc. z MFF UK. Výsledné změny hodnot tryptofanové mobility poskytly informace o hydrofóbních vlastnostech jednotlivých tryptofanů. Detailnější popis přípravy vzorků je popsán v publikaci č. 3.

9.1.2.3 Zhášení fluorescence akrylamidem

Snížení intenzity fluorescence se nazývá zhášení, tento jev je způsoben různými procesy. V proteinech různé tryptofany mohou mít různou přístupnost k rozpouštědлу

obsahující zhášedlo, a tím pádem i různou intenzitu zhášení. V důsledku navázání proteinu k ligandu, vzniku komplexu protein - protein, nebo změnou pH okolního prostředí apod. může dojít k strukturním změnám a ke změnám charakteru mikrookolí tryptofanu. Jako zhášedlo se může použít např. akrylamid, halogeny, kyslík nebo těžké kovy (Albrecht, 2008).

Pro mechanismus zhášení na molekulární úrovni byly zavedeny dva způsoby: zhášení statické, které nastává díky tvorbě nezářivých komplexů se zhášedlem a není závislé na difuzi fluoroforu ani zhášedla. Druhým typem zhášení je zhášení dynamické, které závisí na difuzi fluoroforu a rozpouštědla a je dáno Stern-Volmerovou rovnicí (rovnice č. 5) ve tvaru

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q], \quad (\text{rovnice č. 5})$$

kde I_0 a I jsou intenzity fluorescence v nepřítomnosti, respektive přítomnosti rozpouštědla, k_q je tzv. bimolekulární rychlostní konstanta zhášení (s^{-1}), τ_0 je doba života excitovaného stavu fluoroforu v nepřítomnosti zhášedla (s), $[Q]$ je molární koncentrace zhášedla ($mol \cdot l^{-1}$). Součin k_q a τ_0 je označován jako Stern-Volmerova konstanta K_{sv} .

Stern-Volmerova rovnice má tvar lineární rovnice a vynáší se do grafu jako $\frac{I_0}{I} = f([Q])$. Stern-Volmerovým grafem lze získat hodnotu K_{sv} , která je směrnici vynesené přímky.

Za účelem měření zhášení fluorescence akrylamidem byly použity totožné mutantní formy proC2 a proteinů 14-3-3 zmíněné v kapitole 9.1.2.1. Výsledné hodnoty Stern-Volmerovy konstanty poskytly informace o přístupnosti jednotlivých tryptofanů proC2 k rozpouštědlu. Detailnější popis přípravy vzorků je popsán v publikaci č. 3.

9.1.2.4 Fluorescenčně polarizační esej

Fluorescenčně polarizační esej je rychlá a účinná metoda, kterou lze detekovat interakce proteinu a malé organické molekuly (substrátu, inhibitoru, DNA nebo peptidu). Fluorescenčně značená molekula (fluorofor) je excitována polarizovaným světlem, následně emituje polarizované světlo, které je nepřímo úměrné rychlosti rotace molekuly. Když je fluorofor, který je kovalentně připojen k malému (méně než 1500 Da) ligandu excitován polarizovaným světlem, bude emitované světlo do značné míry depolarizováno. Tento jev je způsoben reorientací fluoroforu během jeho excitovaného stavu. V případě vazby značeného ligandu na protein s vysokou molekulovou hmotností (nad 10 kDa) vykazuje fluorofor nižší úroveň polarizace vzhledem k významně snížené rychlosti rotace komplexu.

Během měření je stejně jako v případě měření anizotropie fluorescence zaznamenána intenzita fluorescence ve dvou orientacích: rovnoběžná s orientací absorbovaného záření, a intenzita fluorescence kolmá na první orientaci.

Hodnotu polarizace P lze pak vypočítat podle rovnice č. 6:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}, \quad (\text{rovnice č. 6})$$

kde P je polarizace fluorescence, I_{\parallel} je intenzita fluorescence v kolmém směru a I_{\perp} je intenzita fluorescence v kolmém směru (Moerke, 2009).

Pro měření fluorescenčně polarizované eseje byly navrženy a objednány syntetické peptidy obsahující jednotlivé fosforylované aminokyselinové zbytky antiporteru Nha1 (pSer472, pSer479, pSer481 a pSer544) značené fluorescenčním markerem FITC (z *angl. fluorescein isothiocyanate*). Detailnější popis přípravy vzorků je popsán v publikaci č. 4.

9.1.3 Maloúhlový rozptyl světla

Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS, z *angl. Small Angle X-ray Scattering*) je metoda často využívaná k získání strukturní informace makromolekul s nízkým rozlišením (minimálně jednotky nm) v porovnání s proteinovou krystalografií. Díky možnosti měření vzorku v roztoku s téměř libovolným složením, je metoda vhodná pro studium proteinů a DNA, které si zachovávají si svou nativní strukturu. Pomocí SAXSu lze získat množství informací popisujících strukturu i dynamiku makromolekuly v roztoku, případně tvorbu komplexů či změnu konformace po vazbě ligandu. Mezi takovéto informace patří např. tvar molekuly/komplexu, její velikost, oligomerní stav či molekulová hmotnost M_w . SAXS se také využívá ke kvantitativní analýze flexibilních systémů (Bernadó and Svergun, 2012).

Roztok makromolekuly o určité koncentraci je umístěn v křemenné kapiláře a je osvětčován rentgenovým elektromagnetickým zářením, které je následně rozptylováno na elektronových oblacích jednotlivých atomů. Záření je detekováno pod malými úhly (0 - 15°). Intenzita rozptýleného záření $I(s)$ je úměrná množství molekul (koncentraci roztoku), na kterých dochází k rozptylu.

Naměřená data se radiálně integrují pro získání jedno-dimensionální závislosti intenzity rozptýleného záření I na úhlu rozptylu 2θ . Rozptylový vektor s závisí na úhlu rozptylu podle rovnice č. 7,

$$s = 4\pi \frac{\sin\theta}{\lambda}, \quad (\text{rovnice č. 7})$$

kde λ je vlnová délka rentgenového záření.

Závislost intenzity rozptýleného záření I na rozptylovém vektoru s je dána rovnicí č. 8:

$$I(s) = 4\pi \int_0^{D_{max}} P(r) \frac{\sin(sr)}{sr} dr, \quad (\text{rovnice č. 8})$$

$P(r)$ je distribuční funkce vzdáleností uvnitř molekuly a D_{max} je maximální vzdálenost v rámci rozptylující molekuly. Při odhadu velikosti molekuly pro malé rozptylové vektory s platí tzv. Guinierova aproximace uvedená v rovnici č. 9.

$$\ln \frac{I_s}{I_0} = \frac{-s^2 R_g^2 q}{3}, \quad (\text{rovnice č. 9})$$

Pro určení gyračního poloměru je nutné R_g měřit jako funkci koncentrace proteinu a extrapolovat na nulovou koncentraci.

Protein Nha1⁴⁴⁰⁻⁵⁹⁶ a Bmh2 byly měřeny v sérii koncentrací 1,9 mg/ml a 1,6 – 7,7 mg/ml. Komplex Nha1⁴⁴⁰⁻⁵⁹⁶:Bmh2 byl měřen v rozmezí koncentrací 5,5 – 24,8 mg/ml v pufru obsahujícím 20 mM TRIS-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM TCEP a 3% (w/v) glycerol. Vyhodnocení dat provedla RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D. pomocí programů ATSAS Software Suite (Konarev et al., 2006), PRIMUS (Konarev et al., 2003), GNOM (Svergun, 1992). Podobný popis průběhu experimentu je uveden v publikaci č. 4.

9.2 Fyziologické metody

Pro identifikaci serinů, které jsou důležité pro interakci kvasničných proteinů 14-3-3 a antiporteru Nha1 byly použity metody *in vivo*. Tato měření byla provedena pod vedením RNDr. Olgy Zimmermannové, Ph.D. na oddělení Membránového transportu na Fyziologickém ústavu AV ČR.

9.2.1 Stanovení tolerance kvasinek k solím na pevném médiu

Pro stanovení tolerance kvasinek k alkalickým iontům byly připraveny Petriho misky s pevným YNB médiem obsahující příslušnou sůl (LiCl, NaCl a KCl) o určité koncentraci a pH. Pro tento pokus bylo připraveno deset mutantních forem antiporteru Nha1 (WT, S472A, S479A, S481A, S544A, S472A + S544A, S479A + S544A, S481A + S544A, S479A + S481A, S472A + S479A + S481A + S544A) a prázdný vektor Yep352 jako kontrolní vzorek.

Tyto varianty Nha1 byly následně transformovány do kvasničného kmene BW31 a pomocí speciálního „ježka“ přeneseny v kapkách na pevné testovací médium. Růst kvasinek probíhal při konstantní teplotě 30 °C. Fotografie dokumentující růst kvasinek v různých prostředích byly pořizovány po sedm dní s intervalem dva dny. Podobný popis průběhu experimentu je uveden v publikaci č. 4.

9.2.2 Měření transportu a stanovení koncentrace alkalických kationtů v buňkách kvasinek

Pro měření transportní aktivity antiporteru Nha1 byly kvasinky s vloženým příslušným vektorem kultivovány při 30°C a při $OD^{600} \sim 0,2$ stočeny, resuspendovány v lisačním pufru a omyty destilovanou vodou. Pro měření transportu sodných kationtů byly kvasinky inkubovány v pufru obsahujícím 100 mM NaCl po dobu 60 min. Po zahájení transportu sledovaného kationtu bylo vždy odebráno přesné množství kvasničné kultury, a to v časových intervalech: 1, 5, 10, 20, 30, 45, 60 min. Transport kationtů byl zastaven propláchnutím kvasinek promývacím pufrům a následně extrakcí jejich buněčného obsahu do extrakčního roztoku. Koncentrace kationtů byla stanovena pomocí atomově absorpční spektroskopie (Rodríguez-Navarro and Ramos, 1984). Pro tento pokus byly použity mutantní formy antiporteru Nha1, které jsou zmíněny v kapitole 9.2.1. Podobný popis průběhu experimentu je uveden v publikaci č. 4.

10 Výsledky a diskuze

10.1 Publikace č. 1

ALBLOVA M, SMIDOVA A, DOCEKAL V, VESELY J, HERMAN P, OBSILOVA V, OBSIL T. (2017) Molecular basis of the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **114**:E9811-E9820.

10.1.1 Úvod

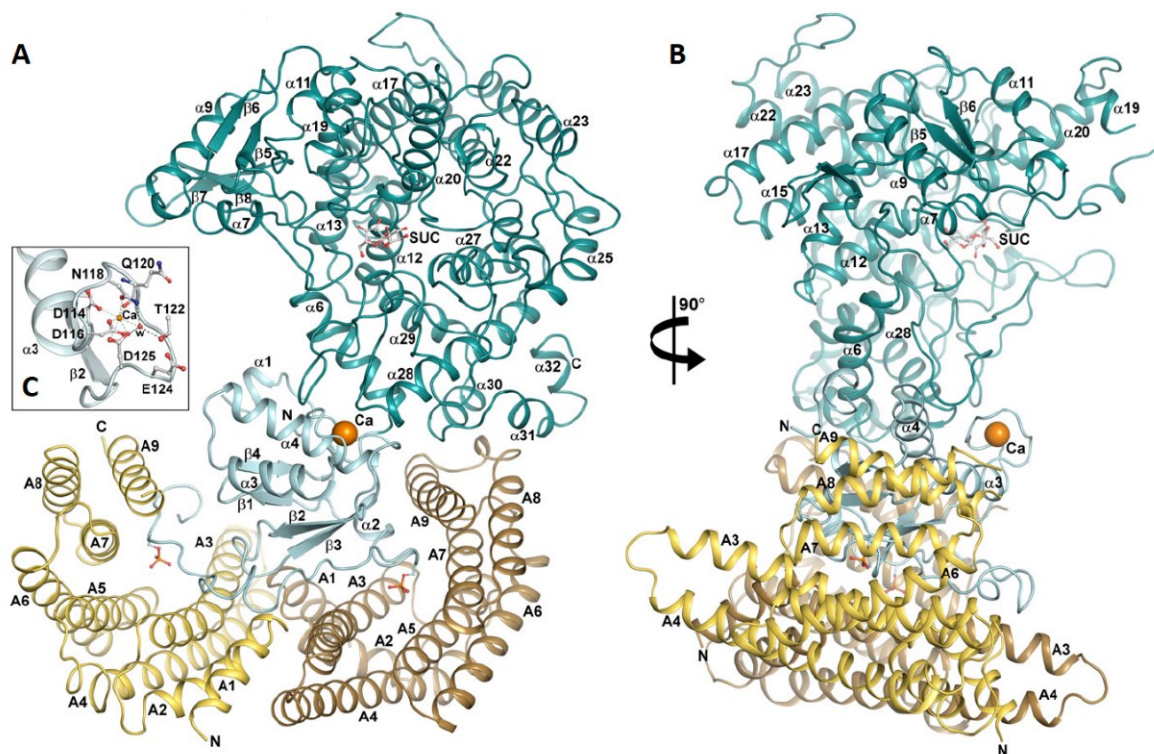
Jako jeden ze zdrojů energie při nestandardních situacích využívají kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* trehalosu, jejíž hydrolyzu zajišťují trehalasy. Dřívějšími studiemi byl nastíněn pravděpodobný mechanismus regulace aktivity Nth1 prostřednictvím kvasničných proteinů 14-3-3. Pro plnou aktivaci Nth1 je nutná přítomnost vápenatých kationtů, fosforylace Ser60 a Ser83 přítomných v N-koncové části Nth1 a tvorba komplexu s proteiny 14-3-3 a to v molárním poměru 1:2 (Macakova et al., 2013). V poslední fázi výzkumu byla získána krystalová struktura Nth1WT:Bmh1ΔC ve vysokém rozlišení, která umožnila objasnění unikátního mechanismu regulace na molekulární úrovni.

10.1.2 Mechanismus regulace neutrální trehalasy 1 pomocí proteinu 14-3-3

Proteiny Nth1WT a Bmh1ΔC byly exprimovány a purifikovány podle standardních optimalizovaných protokolů s dostatečnými výtěžky pro krystalizační pokusy a smíchány v poměru 1:2. Nejprve byl proveden krystalizační screen pomocí automatizovaného systému Gryphon, kdy bylo testováno šest komerčních sad krystalizačních podmínek: Midas, Morpheus, Crystal screen 1+2, JCSG III, Index a Pentaerythritol HTS. Nej kvalitnější krystaly vhodné pro difrakční měření byly získány v optimalizované podmínce o složení: 200 mM octan vápenatý, 100 mM kakodylát sodný (pH 6,5), 18% (w/v) PEG 8000 a 12% (w/w) sacharosu. Data s dostatečným rozlišením byla naměřena prof. RNDr. Tomášem Obšilem, Ph.D. a RNDr. Veronikou Obšilovou, Ph.D. na synchotronu BESSY v Berlíně. Struktura komplexu byla vyřešena prof. RNDr. Tomášem Obšilem, Ph.D.

Na obrázku č. 13 A, B je znázorněna stužková reprezentace Nth1WT v komplexu s proteinem Bmh1 zkráceným o C-konec. Strukturní data byla zpracována metodou molekulárního nahrazení za použití krystalové struktury katalytické domény Nth1 (PDB kód: 5M4A, Aneta Šmídová, 2016) a lidské isoformy 14-3-3ξ (Yang et al., 2006).

Struktura komplexu Nth1WT:Bmh1ΔC potvrdila interakci prostřednictvím fosforylovaných Ser60 a Ser83, ale zároveň s vápník-vazebnou doménou (cca 81 % kontaktů) a katalytickou doménou (19% kontaktů).

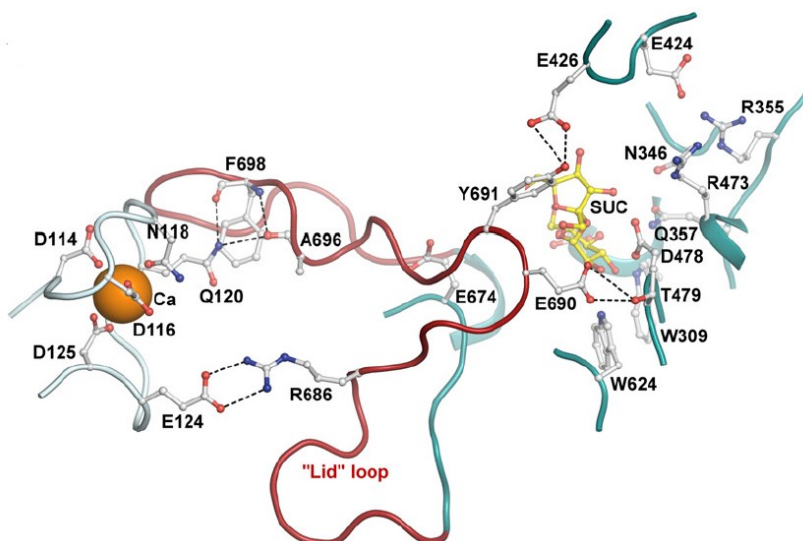


Obrázek č. 13 – **A:** Stručková reprezentace krystalové struktury komplexu Nth1WT s proteinem Bmh1 zkráceným o nestrukturovaný C-konec (PDB kód: 5N6N). Žlutou a hnědou je znázorněn dimer proteinu Bmh1, zelenomodrou je vyznačena katalytická doména Nth1 s navázanou sacharózou (SUC) v aktivním centru. Světle modrou je vyznačena vápník-vazebná doména Nth1 s navázaným kationem vápníku. **B:** Stručková reprezentace krystalové struktury komplexu Nth1WT s proteinem Bmh1 zkráceným o nestrukturovaný C-konec (PDB kód: 5N6N). **C:** Detailní pohled na vápník vazebné místo ve vápník-vazebné doméně.

Krystalová struktura Nth1WT v komplexu s proteinem Bmh1 odhalila prostorové uspořádání okolí fosforylovaných Ser63 a Ser80, které jsou navázány do ligand-vazebných žlábků dimeru proteinu 14-3-3, kde tvoří zásadní nespecifické protein-protein interakce pomocí např. solných můstků (mezi Nth1 Ser60 a Bmh1 Glu136, Glu185).

Vápník vazebná doména (rezidua 96-176), které se nachází mezi nestrukturovaným N-koncem s fosforylovanými Ser60 a Ser80 a katalytickou doménou Nth1, je ve struktuře umístěna do centrálního vazebného kanálu dimeru Bmh, kde tvoří rozsáhlou síť vodíkových vazeb s helixy Bmh1 (konkrétně A1, A3 a A9 a smyčkou mezi A1 a A2). Tato doména je

složena ze tří α helixů a dvou antiparalelních β sheetů. V této doméně se zároveň nachází tzv. EF-hand-like motiv (rezidua D¹¹⁴TDK^{NY}QITIED¹²⁵) a to ve smyčce mezi α 3 helixem a β 2 sheetem. Kation vápníku se nachází v konfiguraci pentagonální bipyramidy a interaguje s postranními řetězci Asp114, Asp116, Asn118 a Asp125, karbonylovou skupinou Gln120 a molekulou vody.



Obrázek č. 14 – Detailní zobrazení interakce mezi katalytickou doménou (tyrkysová) obsahující sekvenci „lid loop“ (červená) a CaBD (modrošedá).

Katalytická doména Nth1 (rezidua 180-751) se v rámci komplexu nachází nad centrálním vazebným kanálem Bmh1 a vápník vazebnou doménou. Kontakty s proteinem Bmh1 jsou zprostředkovány pomocí helixů A8 a A9 na C-konci monomeru Bmh1, interakce s vápník-vazebnou doménou prostřednictvím helixu α 4. V katalytické doméně se nachází krátká konzervovaná aminokyselinová sekvence tzv. „lid loop“ (obrázek č. 14), která hraje při aktivaci Nth1 velmi důležitou roli. „Lid loop“ o sekvenci 685-700 je neuspořádaný, ovšem po vazbě 14-3-3 je stabilizován důležitými rezidui pro katalytickou aktivitu a spolu se správnou orientací katalytické domény a CaBD vůči proteinu 14-3-3 dotváří aktivní centrum enzymu schopné štěpit trehalosu.

10.1.3 Diskuze

V této práci byla vyřešena a publikována krystalová struktura komplexu proteinu 14-3-3 s jeho vazebným partnerem. Tato krystalová struktura odhaluje molekulární mechanismus regulace multidoménového enzymu, který je allostericky ovlivňován proteiny 14-3-3. Dále potvrzuje schopnost proteinů 14-3-3 modulovat a regulovat své vazebné

partnery prostřednictvím interakce s nestruturovanými částmi interakčních partnerů, které obsahují fosforylační místa.

Proteiny 14-3-3 interagují s jinými proteiny pomocí fosforylovaných motivů, tyto specifické interakce jsou potřebné pro správnou funkci mnoha důležitých biologických procesů. Trehalasy, které jsou klíčové enzymy pro buněčný metabolismus, jsou odlišné pro prokaryotní a vyšší eukaryotní organismy. Eukaryotní varianty neutrálních trehalas obsahují delší N-konec s dvěma vazebnými motivy pro proteiny 14-3-3 a vápník vazebnou doménu (CaBD). Katalytická doména navíc obsahuje flexibilní „lid loop“. Vazba proteinu 14-3-3 na fosforylovanou formu neutrální trehalasy 1 (Nth1) dramaticky zvyšuje katalytickou aktivitu Nth1 a to uvedením katalytické domény a CaBD do správné vzájemné prostorové konfigurace. Následně se tak stabilizuje již zmíněný „lid loop“ nad aktivní centrum Nth1, který poskytne klíčové aminokyseliny pro katalýzu.

10.2 Publikace č. 2

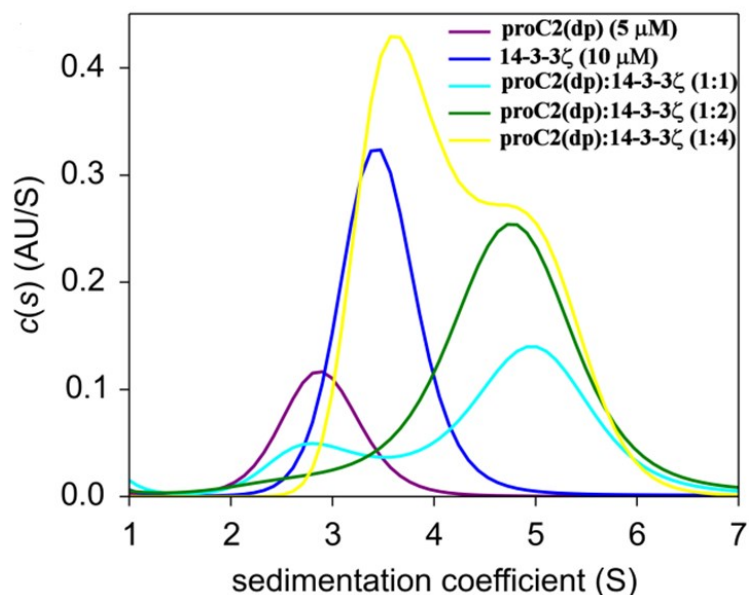
KALABOVA D, SMIDOVA A, PETRVALSKA O, ALBLOVA M, KOSEK D, MAN P, OBSIL T, OBSILOVA V. (2017) Human procaspase-2 phosphorylation at both S139 and S164 is required for 14-3-3 binding. *Biochem Biophys Res Commun.* **493**:940-945.

10.2.1 Úvod

Kaspasa-2 se řadí mezi nejkonzervovanější kaspasy napříč organismy a hraje důležitou roli v apoptose a metabolismu. Ve formě proenzymu kaspasa-2 obsahuje tři domény: v N-koncové části doména CARD a v C-koncové části podjednotky p19 a p12. V případě maturace na kaspasu-2 je odštěpena doména CARD a vzniká heterotetramer. Kaspasa-2 ve formě neaktivního proenzymu interaguje s proteinem 14-3-3, kdy je blokována její maturace a aktivace. Interakce proteinu 14-3-3 a prokaspasy-2 (proC2) byla predikována s možnými dvěma interakčními místy: fosforylovaný Ser139 a Ser164 (Tinti et al., 2014), nicméně vznik této interakce nebyl experimentálně potvrzen. Cílem publikace č. 2 bylo potvrdit tvorbu komplexu proC2 a proteinu 14-3-3 a potvrdit predikovaná fosforylační místa. Potvrzení interakce proC2 a proteinu 14-3-3 a její charakterizace může v důsledku vést k pochopení role proC2 v patogenních procesech.

10.2.2 Ověření interakce prokaspasy-2 a proteinu 14-3-3 prostřednictvím fosforylovaných Ser139 a Ser164

Pro ověření interakce proC2 a proteinu 14-3-3 ζ *in vitro* byly připraveny oba proteiny v dostatečném množství a čistotě pro měření dat analytické ultracentrifugace podle zavedeného protokolu. Konstrukt proC2 obsahující všechny tři domény (sekvence 32-452) byl obsažen v nerozpustných frakcích, z tohoto důvodu byl připraven zkrácený konstrukt (sekvence 123-452), který neobsahoval doménu CARD. ProC2¹²³⁻⁴⁵² byla fosforylována na obou již zmíněných serinových zbytcích a fosforylace byla ověřena pomocí nativní TBE elektroforézy. Pro měření analytické ultracentrifugace byly roztoky proteinu 14-3-3 ζ , proC2 a komplex proteinů v různých poměrech a přeneseny do speciálních kyvet. Měření a vyhodnocení dat bylo provedeno Mgr. Olívií Petřalskou, Ph.D.



Obrázek č. 15 – Výsledná distribuce sedimentačních koeficientů S proC2, proteinu 14-3-3 ζ a jejich různých poměrů.

Výsledky měření analytické centrifugace potvrdily tvorbu komplexu proC2 a proteinu 14-3-3 ζ , kdy jsou oba serinové zbytky (Ser139 a Ser164) fosforylované a zároveň bylo zjištěno, že jedna molekula proC2 se váže na dimer proteinu 14-3-3. Na obrázku č. 15 je zeleně znázorněná distribuce sedimentačních koeficientů o jenom lokálním maximu ukazuje na tvorbu komplexu o sedimentačním koeficientu o hodnotě přibližně 4,8.

10.2.3 Diskuze

Kaspasa-2 patří mezi nejvíce konzervované kaspasy, která ovlivňuje patobiochemické procesy spojené s rakovinovým bujením, navíc obsahuje možná fosforylační místa, na která se váží proteiny 14-3-3. Jako nejpravděpodobnější fosforylační místa byla predikována Ser139 a Ser164, které jsou umístěny v sekvenci spojující domény CARD a p19. Výsledky, které shrnuje publikace č. 2, jsou v souladu s výsledky bioinformatické predikce a potvrzují interakci proC2 s proteinem 14-3-3 v molárním poměru 1:2 a za současné plné fosforylace obou serinů (Ser139 a Ser164). Porovnání sekvencí kaspas navíc ukázalo na přítomnost jaderné lokalizační sekvence (NLS, rezidua P¹⁴⁹LYKKLRL¹⁵⁶) u proC2, která se nachází v totožné spojovací sekvenci jako interakční místa pro proteiny 14-3-3. Je proto pravděpodobné, že vazba proteinu 14-3-3 na proC2 bude mít vliv na subcelulární lokalizaci proC2.

10.3 Publikace č. 3

SMIDOVA A, ALBLOVA M, KALABOVA D, PSENAKOVA K, ROSULEK M, HERMAN P, OBSIL T, OBSILOVA V. (2018) 14-3-3 protein masks the nuclear localization sequence of caspase-2. *FEBS J.* **285:4196-4213.**

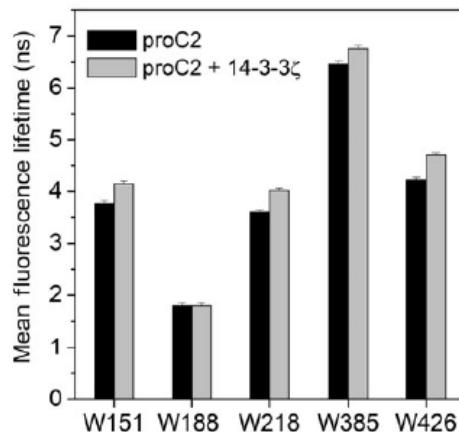
10.3.1 Úvod

V přechozí publikaci (kapitola 10.2) byla potvrzena interakce fosforylované prokaspasy-2 (Ser139 a Ser164) a proteinu 14-3-3ζ *in vitro*. V další části projektu byla jako hlavní cíl vytyčena charakterizace struktury proC2 samotné a v komplexu s proteinem 14-3-3. Krystalizační pokusy komplexu nicméně vždy vyústily v krystaly v neodpovídající kvalitě pro difrakční měření, nebo krystaly obsahující pouze protein 14-3-3. Z tohoto důvodu pro částečnou strukturní charakterizaci byly použity jiné metody strukturní biologie. Část použitých metod využívala jevu fluorescence: časově rozlišené dohasínání intenzity fluorescence, časově rozlišené dohasínání anisotropie fluorescence, zhášení fluorescence akrylamidem. Strukturní charakterizace změn proC2 vlivem vazby proteinu 14-3-3 pomůže odhalit molekulární mechanismus této regulace, a tím přispět k porozumění roli kaspasy-2 v biomedicínsky důležitých procesech.

10.3.2 Strukturní charakterizace komplexu prokaspasy-2 a proteinu 14-3-3

Za účelem měření série fluorescenčních měření bylo připraveno celkem pět tryptofanových mutantů proC2, jednotlivé tryptofany se nacházely na pozicích: 151, 188, 218, 385 a 426, které pokrývaly různé části proC2. Trp151 se nachází v jaderné lokalizační sekvenci, Trp188 a Trp218 se nachází v doméně p19 a Trp385 s Trp428 se nachází v doméně p12. Dále byl připraven protein 14-3-3 ζ bez přirozeně se vyskytujících tryptofanů (14-3-3 ζ W59F a W228F) podle zavedeného postupu (Obsilova et al., 2004). Pomocí nativní TBE elektroforézy byla potvrzena tvorba komplexů jednotlivých mutantních forem a upraveným proteinem 14-3-3. U všech mutantních forem proC2 byly zjištěny teploty tání pomocí metody diferenční skenovací fluorimetrie (Niesen et al., 2007). Výsledné hodnoty teplot tání ukázaly, že cílenou mutagenézí nedošlo ke změně stability proteinů.

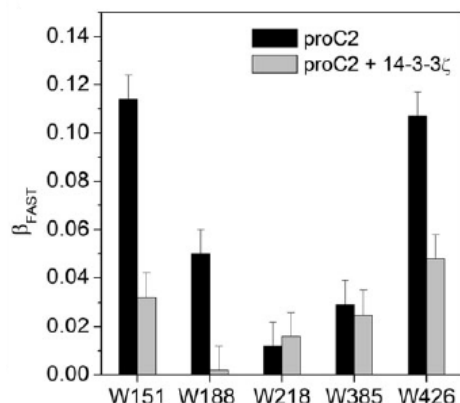
V případě časově rozlišeného dohasínání intenzity fluorescence shrnuté na obrázku č. 16 byly rozdíly v τ_{mean} u všech testovaných variant proC2 v komplexu s proteinem 14-3-3 o 0,4 ns vyšší než v případě apo formy. Tento rozdíl způsobuje pravděpodobně snížení intramolekulárního zhášení fluoroforu, který je stíněn v důsledku vazby proteinu 14-3-3 na proC2.



Obrázek č. 16 – Střední doby života excitovaného stavu pro proC2 v nepřítomnosti (černé sloupce) a v přítomnosti proteinu 14-3-3 ζ noW (šedé sloupce).

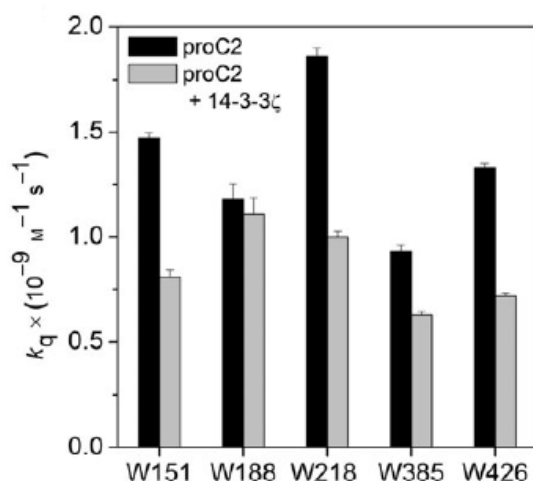
Na obrázku č. 17 jsou shrnuty hodnoty naměřených amplitud β_{FAST} , které charakterizují mikrookolí tryptofanů z hlediska hydrofobicity. Trp151 a Trp426 vykazují výrazně nižší hodnotu β_{FAST} po navázání proteinu 14-3-3 na proC2, tedy dané mikrookolí tryptofanu se stává rigidnějším. Podobná situace nastává i v případě Trp188. Na druhou

stranu Trp218 a Trp385 vykazují rigidní mikrookolí v nenávané formě proC2, po tvorbě komplexu s proteinem 14-3-3 se mikrookolí tryptofanů signifikantně nezmění.

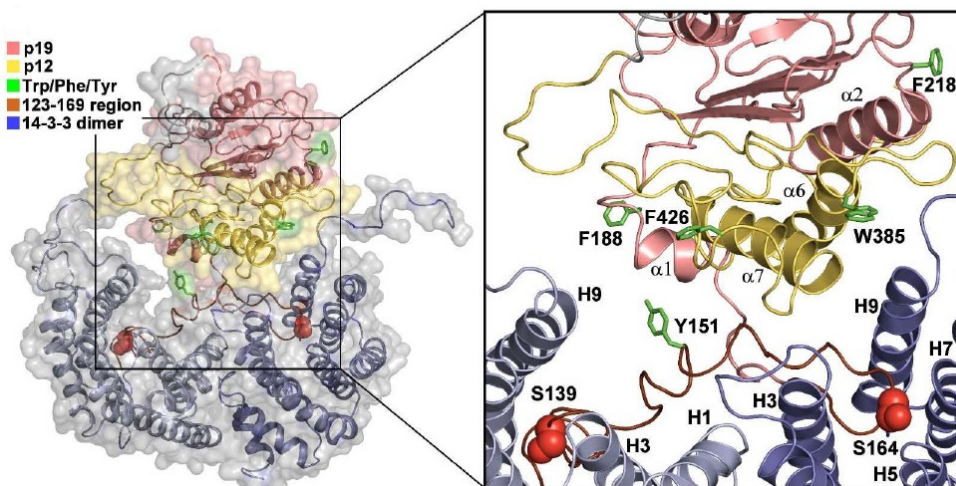


Obrázek č. 17 – Změny v amplitudách v intracelulárních mobilitách (β_{FAST}) pro proC2 v nepřítomnosti (černé sloupce) a v přítomnosti proteinu 14-3-3 ζ noW (šedé sloupce).

Jako poslední ze série fluorescenčních pokusů bylo měření přístupnosti zkoumaných tryptofanů k rozpouštědlu pomocí zhášedla (akrylamidu). Bimolekulární zhášecí konstanty byly odečteny ze Stern-Volmerových výnosů. Na obrázku č. 18 jsou vyznačeny hodnoty bimolekulární zhášecí konstant variant proC2 samotné a v komplexu s proteinem 14-3-3. Přístupnost Trp151, Trp218 a Trp426 se dramaticky (přibližně o 46%) snížila po navázání proteinu 14-3-3. V případě Trp385 se přístupnost snížila méně (přibližně o 32%) a změny v k_q u Trp188 jsou nesignifikantní.



Obrázek č. 18 – Hodnoty spočtených bimolekulárních zhášecích konstant k_q pro proC2 v nepřítomnosti (černé sloupce) a v přítomnosti proteinu 14-3-3 ζ noW (šedé sloupce).



Obrázek č. 19 – Model komplexu proC2 a proteinu 14-3-3, kde doména p19 je označena světle růžovou, doména p12 je vyznačena žlutě, dimer proteinu 14-3-3 je vyznačen modře. Červeně jsou zvýrazněny fosforylační místa Ser139 a Ser164, postranní řetězce mutovaných aminokyselin na tryptofany jsou vyznačeny zeleně.

10.3.3 Diskuze

V publikaci č. 3 byla potvrzena interakce proC2 a proteinu 14-3-3 prostřednictvím fosforylovaných Ser139 a Ser164 a určeny základní charakteristiky vzniklého komplexu. V další části projektu byla zaměřena pozornost na biofyzikální charakterizaci proC2 samotné a v komplexu s proteinem 14-3-3. Výsledky fluorescenčních měření v kombinaci s informacemi získané jinými strukturními technikami (SAXS) ukazují na přítomnost jaderné lokalizační sekvence (NLS) v centrálním vazebném kanálu proteinu 14-3-3 a samotné fosforylované Ser139 a Ser164 se nacházejí v ligand-vazebných žlábcích protomeru 14-3-3. Komplex proC2 a proteinu 14-3-3 je kompaktní a rigidní.

Větší část domény p12 je v těsném kontaktu s centrálním vazebným kanálem proteinu 14-3-3, konkrétně helix $\alpha 7$ interaguje se smyčkou mezi helixy H3 a H4 proteinu 14-3-3 a zároveň s částí již zmíněné nestrukturované sekvence s fosforylačními místy na N-konci proC2. Toto zjištění podporují výsledky zhášení tryptofanové fluorescence, kdy u Trp385 a Trp426 (oba se nachází v doméně p12) jsou méně přístupné k rozpouštědлу po vazbě proteinu 14-3-3, podobně jako Trp151, který je součástí NLS.

Podle obrázku č. 19 celkové uspořádání komplexu navíc ukazuje na sterické blokování p12 domény proC2 proteinem 14-3-3. Tato doména je důležitá pro oligomerizaci

caspasy-2 a tak i aktivaci kaspasy-2. V modelu je znázorněna sekvence NLS obsahující Trp151 naproti residuu z domény p12 (W426).

Pro kaspasu-2 je charakteristický transport do jádra (Baliga et al., 2003). Tento proces je zajištěn jadernou lokalizační sekvencí (NLS), která těsně interaguje s proteiny 14-3-3. V několika případech byla potvrzena role proteinů 14-3-3 jako mediátoru subcelulární lokalizace jejich vazebných partnerů. Je tedy pravděpodobné, že proteiny 14-3-3 nejen blokují aktivaci proC2, ale zároveň svou interakcí ovlivňují lokalizaci kaspasy-2 v rámci buňky.

10.4 Publikace č. 4

SMIDOVA A, STANKOVA K, PETRVALSKA O, LAZAR J, SYCHROVA H, OBSIL T, ZIMMERMANNNOVA O, OBSILOVA V. (2019) The activity of *Saccharomyces cerevisiae* Na⁺, K⁺/H⁺ antiporter Nha1 is negatively regulated by 14-3-3 protein binding at serine 481. Zasláno do časopisu.

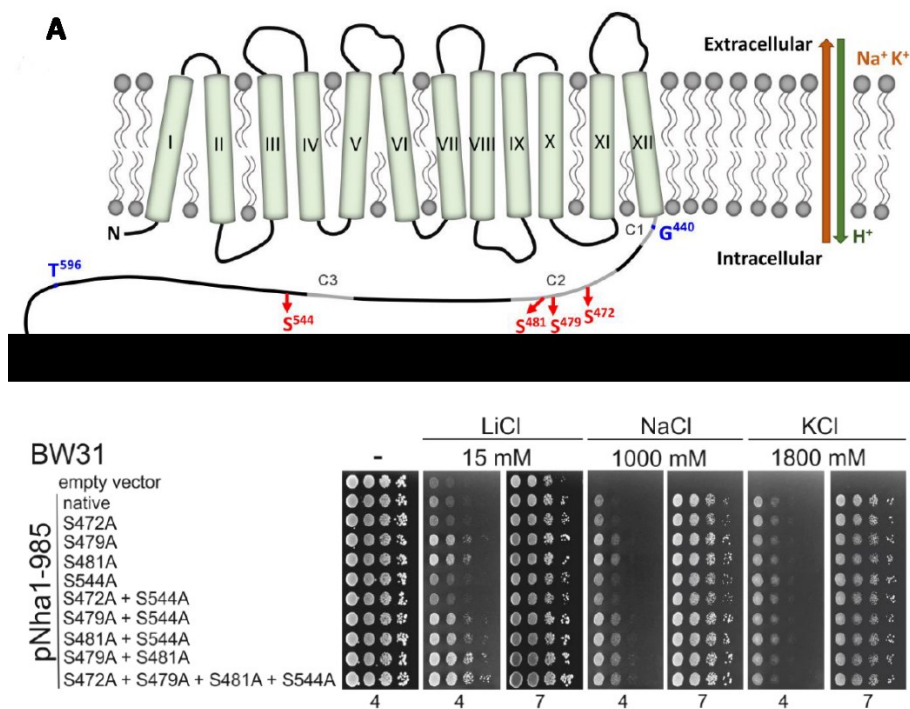
10.4.1 Úvod

Poslední částí výsledků je publikace s výsledky fyziologické a strukturní charakterizace kvasničného antiporteru Nha1. Tento transmembránový protein pomáhá udržovat stálé vnitřní prostředí buňky. Buňka prostřednictvím antiporteru Nha1 je schopna rychle regulovat koncentraci alkalických kationtů, které mohou nepříznivě ovlivňovat mnoho důležitých buněčných procesů. V roce 2012 byla technikami *in vivo* potvrzena interakce *Saccharomyces cerevisiae* Nha1 s kvasničnými isoformami proteinu 14-3-3 a to prostřednictvím cytoplasmatického nestrukturovaného C-konce (Zahrádka et al., 2012). Jako pravděpodobné místo interakce byl označen Ser472. Výsledky uvedené v této kapitole popisují roli proteinů 14-3-3 v regulaci kvasničného antiporteru Nha1.

10.4.2 Úloha proteinů 14-3-3 v regulaci kvasničného antiporteru Nha1

Nejprve byla identifikována možná fosforylační místa na C-konci antiporteru Nha1 pro interakci proteinů 14-3-3. Jako nejvíce pravděpodobná fosforylační místa byly vybrány Ser472, Ser479, Ser481 a Ser544 (zobrazeny na obrázku 20 A). Pro identifikaci vazebného místa pro 14-3-3 byla použita nejprve cílená mutagenese, kdy byly připraveny mutantní formy antiporteru Nha1: S472A, S479A, S481A a S544A. Vzhledem k faktu, že proteiny 14-3-3 interagují převážně prostřednictvím dvou motivů současně, byly navíc připraveny

dvojité mutanty: S472A + S544A, S479A + S544A, S481A + S544A, S479A + S481A, a nakonec mutantní forma se čtyřmi mutovanými seriny S472A + S479A + S481A + S544A. Mutantní formy byly exprimovány v kvasničném kmenu BW3, který neobsahuje žádné mechanismy transportu kationtů z buněk, a tím jsou citlivé na okolní prostředí. Růst kvasinek byl monitorován po sedm dní v 30 °C. Z obrázku č. 20 B vyplývá, že mutace S479A a S481A vykazují vyšší toleranci k lithným kationtům než Nha1 bez vnesených mutací, resp. zvýšily aktivitu antiporteru.

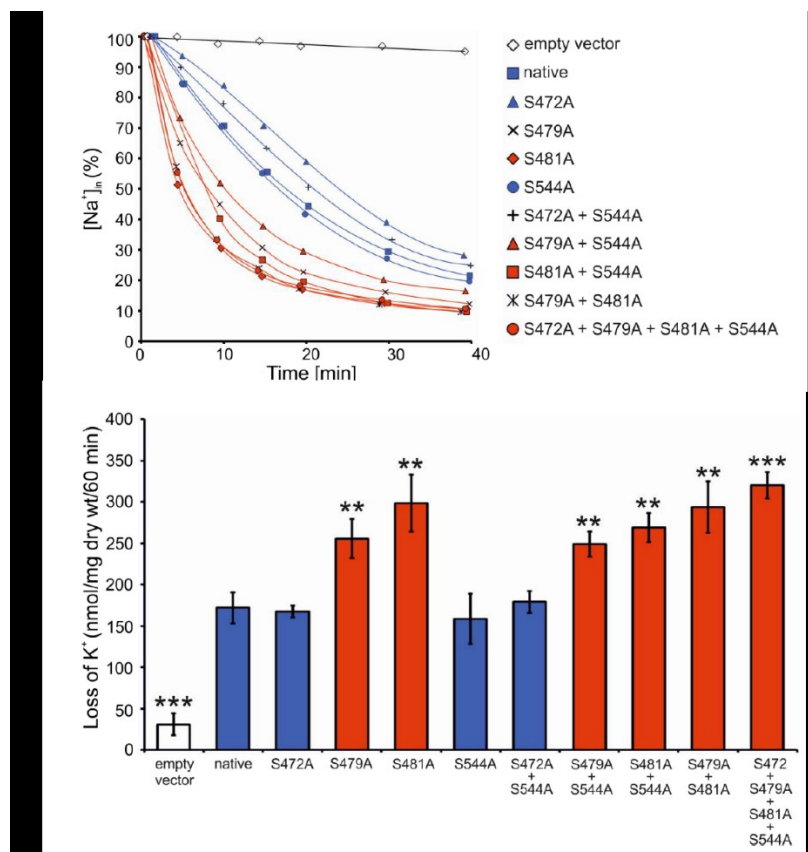


Obrázek č. 20 – A: Výřez schématu antiporteru Nha1, kde jsou červeně vyznačena možná místa interakce pro proteiny 14-3-3, modře vyznačenými rezidui konstrukt Nha1⁴⁴⁰⁻⁵⁹⁶ **B:** Výsledky stanovení tolerance mutantních forem antiporteru Nha1 k různým koncentracím LiCl, NaCl a KCl. Fotografie byly pořízeny čtyři (resp. sedm) dní po nanesení kvasničné kultury na pevné médium.

Pro potvrzení výsledků kapkových testů byl měřen výstup sodných nebo draselných kationtů. Intracelulární koncentrace sodných kationtů je v případě kontrolního vzorku konstantní, což potvrzuje export kationtů výhradně pomocí antiporteru Nha1 a jeho mutantních forem. V případě mutací Ser479 a Ser481 nebo jejich kombinace s Ser544 vykazuje rychlejší transport sodíku z buněk kvasinek než Nha1 WT. Nejrychlejší aktivita antiporteru Nha1 byla zaznamenána u mutací Ser479, Ser481, jejich kombinace a varianta se čtyřmi mutacemi (obrázek č. 21 A).

Z obrázku č. 21 B nejsou patrné žádné změny v toleranci studovaných mutantních forem k draselným kationtům, z toho důvodu byl také měřen transport draselných kationtů. Výsledky jsou shrnuty na obrázku č. 21 B, kdy nejvyšší transportní aktivitu opět vykazují mutace Ser479, Ser481 a jejich mutace.

Výsledky experimentů *in vivo* naznačují Ser479 a Ser481 jako významná regulační místa antiporteru Nha1.

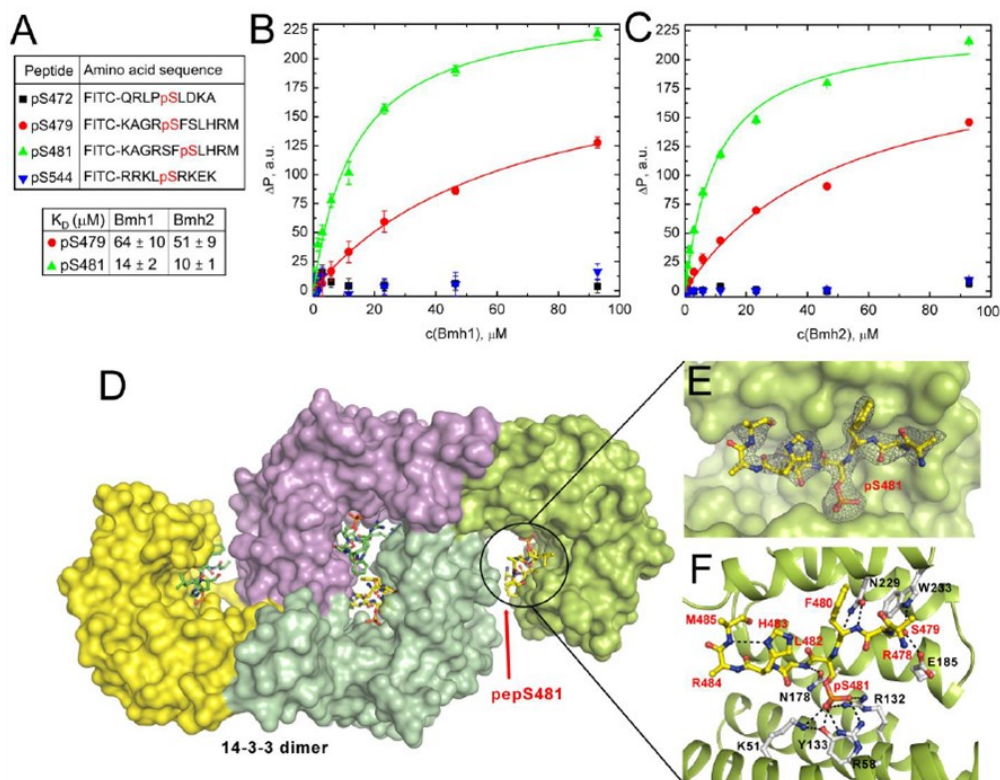


Obrázek č. 21 – A: Výsledky úbytku sodného kationtu z buněk kvasinek obsahující deset variant antiporteru Nha1 a kontrolní vzorek. Na ose x je vyznačen čas (min), na ose y je procentuální množství sodíku. **B:** Výsledky měření výstupu draselných kationtů z buněk kvasinek pro obsahující deset variant antiporteru Nha1 a kontrolní vzorek.

V další fázi projektu bylo nutné potvrdit výsledky kapkových testů a měření výstupu kationtů. Za tímto účelem byly objednány čtyři syntetické peptidy, každý z nich reprezentoval jednotlivý fosforylovaný serin a zároveň byly značeny fluorescenční značkou FITC na N-konci. Pomocí fluorescenčně polarizované eseje byly změřeny peptidů k proteinům Bmh1 a Bmh2 (obrázek č. 22 A, B, C). V případě peptidů obsahující fosforylovaný Ser472 a fosforylovaný Ser544 nebyla zjištěna žádná afinita k oběma

proteinům Bmh. Peptidy obsahující fosforylovaný Ser481 a fosforylovaný Ser479 asociovaly s proteiny Bmh, vyšší afinitu vykazoval peptid s Ser481 s disociační konstantou (14 μ M pro protein Bmh1, 10 μ M pro protein Bmh2). V případě peptidu s fosforylovaným Ser479 byla odečtena afinita 64 μ M pro protein Bmh1, 51 μ M pro protein Bmh2. Výsledky fluorescenčně polarizační eseje potvrdily vliv Ser479 a Ser481 na aktivitu antiporteru Nha1 a to prostřednictvím proteinů 14-3-3.

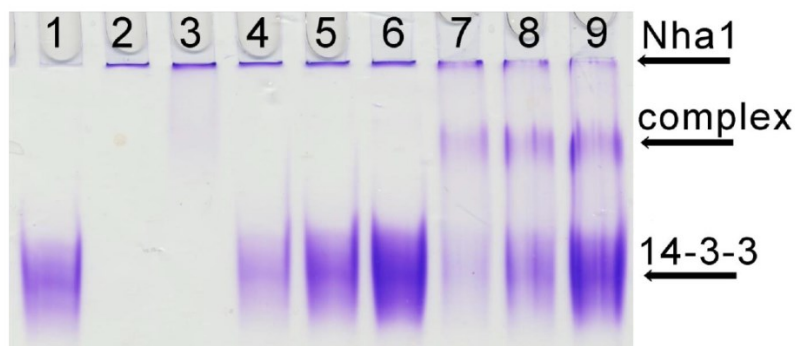
Na základě výsledků fluorescenčně polarizované eseje byly provedeny krystalizační pokusy s proteinem Bmh1 Δ C ve směsi s peptidem obsahující fosforylovaný Ser481 (rezidua RSFpSer481LHR), který navíc částečně odpovídá vazebnému motivu pro protein 14-3-3 (motiv I). Výsledná struktura byla vyřešena pomocí metody molekulárního nahrazení, kdy byl použit model Nth1WT:Bmh1 Δ C (PDB kód: 5N6N) s rozlišením 2,9 Å (obrázek 22 D, E). V jedné asymetrické jednotce se nacházely dva dimery proteinu 14-3-3, v každém ligand-vazebném žlábků proteinu Bmh1 Δ C byl navázán peptid (Arg476 až Met485), residua Ala476 a Gly477 chybí pravděpodobně vinou jejich flexibility. Na obrázku č. 22 F jsou zobrazené kontakty fosforylovaného Ser481 s postranními řetězci proteinu Bmh1 Δ C (Arg58, Arg132 a Tyr133), vodíkové vazby mezi rezidui Bmh1 Δ C (Asn178, Glu185, Asn229 a Trp233) a peptidem antiporteru Nha1 (Ser479, Phe480 a Leu482), dále van der Waalovy kontakty mezi rezidui Bmh1 Δ C (Leu177, Val181, Leu225) a peptidem (Phe480, Ser481 a Leu482).



Obrázek č. 22 – *A*: Aminokyselínová sekvence syntetických peptidů použitých pro fluorescenčně polarizační esej, červeně jsou vyznačeny fosforylované seriny. *B*: Výsledky fluorescenčně polarizační eseje pro značené syntetické peptidy a protein Bmh1. *C*: výsledky fluorescenčně polarizační eseje pro značené syntetické peptidy a protein Bmh2. Výsledné hodnoty K_D a směrodatné odchylky jsou průměrem ze tří nezávislých měření. *D*: Asymetrická jednotka dvou dimerů proteinů Bmh1ΔC s navázanými peptidy v ligand-vazebných žlábcích. *E*: Detailní zobrazení interakce proteinu Bmh1ΔC a peptidu antiporteru Nha1. *F*: Detailní zobrazení interakce proteinu Bmh1ΔC a peptidu antiporteru Nha1s vyznačenými klíčovými protein-proteinovými kontakty.

V poslední části projektu byla upřena pozornost na strukturní charakterizaci cytoplasmatického C-konce antiporteru Nha1 samotného a navázaného do komplexu s proteinem Bmh2. Nejprve byly provedeny pokusy o expresi celého nestrukturovaného C-konce antiporteru Nha1 (sekvence 440-985), nicméně tento konstrukt byl nerozpustný. Proto byl do genu pro tuto část vnesen stop kodon na pozici Phe597. Vzniklý konstrukt Nha1⁴⁴⁰⁻⁵⁹⁶ byl již rozpustný a byl exprimován a purifikován s dostatečným výtěžkem pro všechna biofyzikální měření. Konstrukt Nha1⁴⁴⁰⁻⁵⁹⁶ byl následně fosforylován pomocí PKA podle naší laboratorní zavedeného protokolu a fosforylační status byl ověřen pomocí hmotnostní spektroskopie.

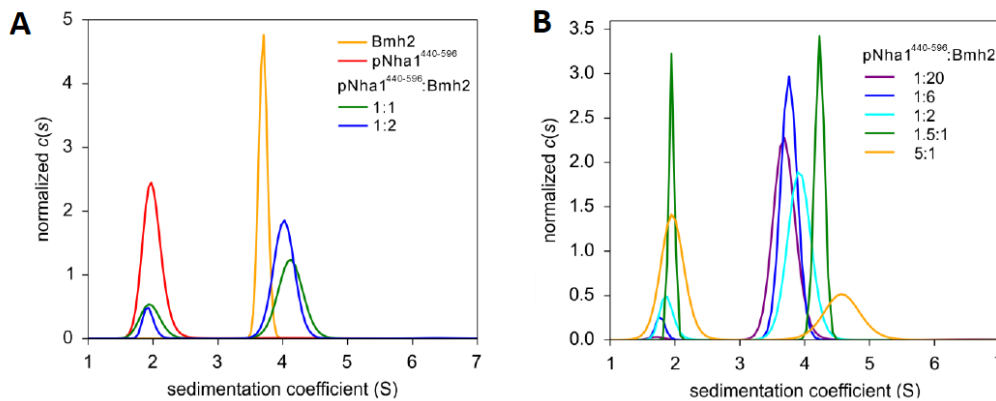
Nejprve byla ověřena tvorba komplexu Nha1⁴⁴⁰⁻⁵⁹⁶ a proteinu Bmh2 pomocí nativní TBE elektroforézy. Na obrázku č. 23 je v jamkách 7 – 9 znázorněn vznik komplexu výhradně fosforylované formy Nha1⁴⁴⁰⁻⁵⁹⁶:Bmh2 *in vitro*.



Obrázek č. 23 – Výsledný gel nativní TBE-elektroforézy, kdy v jamce 1 se nachází samotný kvasničný protein 14-3-3 (Bmh2); v jamce 2 je konstrukt nefosforylované Nha1⁴⁴⁰⁻⁵⁹⁶; ve třetí konstrukt fosforylované Nha1⁴⁴⁰⁻⁵⁹⁶; v jamkách 4 až 6 směs nefosforylované Nha1⁴⁴⁰⁻⁵⁹⁶:Bmh2 v poměrech 2:1, 1:1 a 1:2 a v jamkách 7 až 9 směs fosforylované Nha1⁴⁴⁰⁻⁵⁹⁶:Bmh2 v poměrech 2:1, 1:1 a 1:2.

Interakce mezi konstruktem Nha1⁴⁴⁰⁻⁵⁹⁶ a proteinem Bmh2 byla použita metoda analytické ultracentrifugace. Výsledky měření sedimentační rychlosti poskytly informace o stechiometrii komplexu. Na obrázku č. 24 A jsou výsledné distribuce sedimentačních koeficientů konstruktu Nha1⁴⁴⁰⁻⁵⁹⁶, proteinu Bmh2 a jejich směsí o různých poměrech. Hodnoty sedimentačních koeficientů odpovídají molekulové váze ~ 30 kDa pro Nha1⁴⁴⁰⁻⁵⁹⁶ a ~ 60 kDa pro protein Bmh2, což naznačuje monomerní stav konstruktu Nha1⁴⁴⁰⁻⁵⁹⁶ a dimerní stav proteinu Bmh2 a stechiometrii komplexu v poměru 1:2.

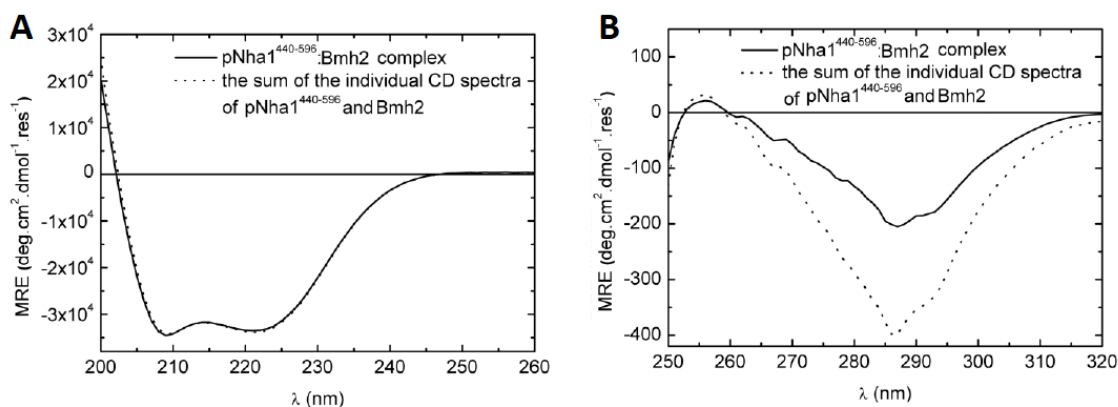
Metoda analytické ultracentrifugace je zároveň ideální pro určení rovnovážné disociační konstanty nejen proteinových komplexů. Pro toto měření byla připravena série komplexů Nha1⁴⁴⁰⁻⁵⁹⁶ a proteinu Bmh2 v pěti různých poměrech (1:20; 1:6; 1:2; 1,5:1; 5:1), hodnota rovnovážné disociační konstanty byla odhadnuta na přibližnou hodnotu 6 μ M (obrázek 24 B).



Obrázek č. 24 – A: Výsledná distribuce sedimentačních koeficientů S konstruktů $Nha1^{440-596}$ v nefosforylované a fosforylované formě, proteinu $Bmh2$ a jejich různých poměrů pro detekci interakce konstruktů $Nha1^{440-596}$ a proteinu $Bmh2$. **B:** Výsledná distribuce sedimentačních koeficientů S konstruktů $Nha1^{440-596}$, proteinu $Bmh2$ a jejich různých poměrů pro určení K_D .

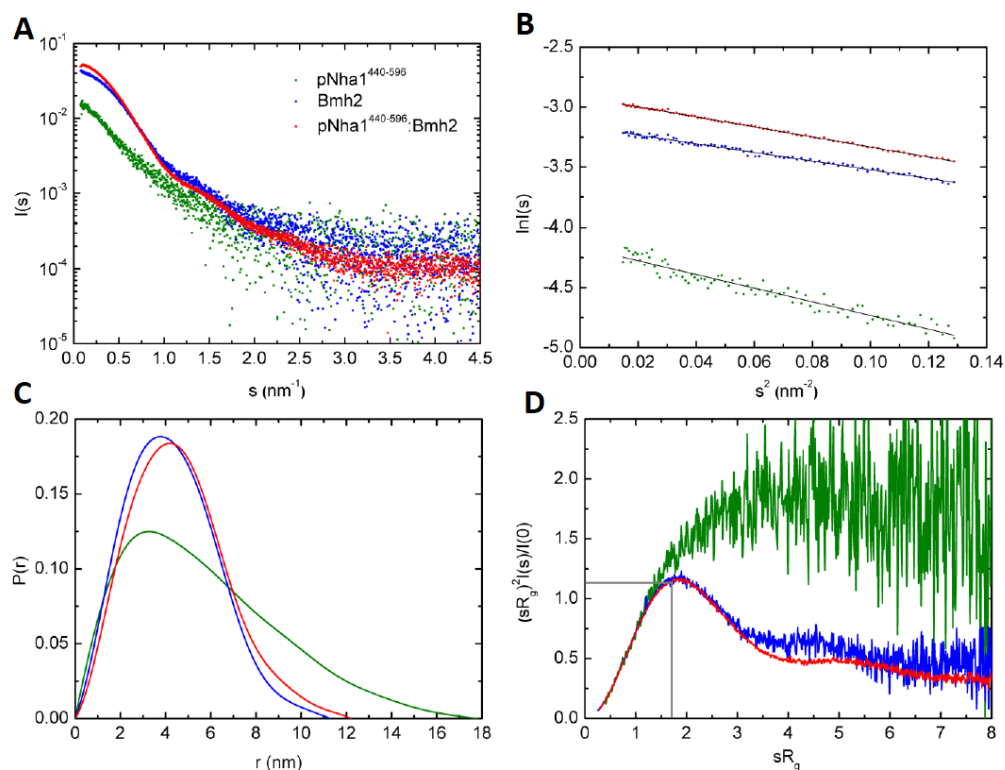
Poslední část projektu byla věnována pozornost biofyzikální a strukturální charakterizaci konstruktů $Nha1^{440-596}$ samotného a v komplexu s proteinem $Bmh2$. Nejprve byly využity predikční algoritmy pro určení neuspořádanosti proteinů a jeho částí: PONDR (Obradovic et al., 2003), IUPRED (Dosztanyi et al., 2005) a DISOPRED (Ward et al., 2004). Tato predikce ukázala na vysokou strukturovanost transmembránové části antiporteru $Nha1$, zatímco cytoplasmatický C-konec je neuspořádaný.

Pro odhalení případných strukturálních změn byly měřeny CD spektra pro daleké oblasti UV (200-260 nm) a pro blízké oblasti UV (250-320 nm) vždy pro samotný fosforylovaný konstrukt $Nha1^{440-596}$, protein $Bmh2$ a jejich komplex v poměru 1:2. Na obrázku č. 25 A je srovnání CD spekter měřených v dalekých oblastech UV pro studované proteiny, které neprokázalo změny v sekundární struktuře jednotlivých proteinů. Na obrázku č. 25 B je srovnání CD spekter měřených v blízkých oblastech UV pro studované proteiny, kde je výrazná změna v oblasti 270-300 nm. Tato oblast CD spekter je citlivá na strukturální změny Trp a Tyr. V souhrnu CD spektra měřená v blízké oblasti UV ukazují na výraznou konformační změnu konstruktů antiporteru $Nha1$ po vazbě na protein $Bmh2$.



Obrázek č. 25 – A: Porovnání spekter cirkulárního dichroismu měřených v dalekých oblastech UV. Plná čára charakterizuje komplex $Nha1^{440-596}:Bmh2$, přerušovaná čára charakterizuje součet individuálních spekter konstruktů $Nha1^{440-596}$ a proteinu $Bmh2$. **B:** Porovnání spekter cirkulárního dichroismu měřených v dalekých oblastech UV. Plná čára charakterizuje komplex $Nha1^{440-596}:Bmh2$, přerušovaná čára charakterizuje součet individuálních spekter konstruktů $Nha1^{440-596}$ a proteinu $Bmh2$.

Pro další strukturní charakterizaci konstruktů $Nha1^{440-596}$ samotného a jeho konformační změny po vazbě na protein $Bmh2$ byla použita metoda malouhlového rozptylu světla (SAXS) s nízkým rozlišením. Difrakční data, zobrazena na obrázku č. 26 A, byla sbírána pro samotný konstrukt $Nha1^{440-596}$, protein $Bmh2$ a jejich komplexy připraveny v molárním poměru 1:2 a to v různých koncentracích. Na obrázku č. 26 B jsou zobrazeny Guinierovy výnosy pro fosforylovanou formu konstruktů $Nha1^{440-596}$ (zelená), protein $Bmh2$ (modrá) a komplex $Nha1^{440-596}:Bmh2$ (červená), jejichž průběh potvrdil monodisperzitu všech měřených vzorků, kdy pod hodnotou $sR_g < 1,3$ je přímka lineární (rozptylového vektoru je označen písmenem s a R_g je gyrační poloměr). V další části obrázku č. 26 C je vyznačena $P(r)$ funkce pro všechny měřené vzorky, charakter této distribuční funkce ukazuje na symetrický a kompaktní tvar, zatímco průběh $P(r)$ funkce pro samotný protein $Nha1^{440-596}$ je vysoce nesymetrický a protáhlý. Maximální délka konstruktů $Nha1$ je navíc výrazně větší než u $Bmh2$ a komplexu $Nha1^{440-596}:Bmh2$. Úroveň flexibility studovaných proteinů je charakterizována normalizovaným Kratkeho výnosem (obrázek č. 26 D). Typický rigidní a globulární tvar, kdy na vrcholu lokálního maxima byla odečtena hodnota $sR_g = 1,73$, byl potvrzen pouze u proteinu $Bmh2$ a komplexu $Nha1^{440-596}:Bmh2$. Pro samotný protein $Nha1^{440-596}$ má křivka tvar tzv. hyperbolické plošiny, typický pro nestrukturované proteiny.



Obrázek č. 26 – *A:* Experimentálně změřené intenzity rozptylu $I(s)$ jako funkce rozptýleného vektoru s pro fosforylovaný konstrukt $Nha1^{440-596}$ (zelená), protein $Bmh2$ (modrá) a jejich komplexu (červená). *B:* Guinierův výnos, kdy na ose y jsou hodnoty $\ln I(s)$ a na ose x rozptylový vektor pro studované proteiny. *C:* $P(r)$ funkce spočtena pomocí programu GNOM pro studované proteiny. *D:* Normalizované Kratkého výnosy pro studované proteiny.

10.4.3 Diskuze

Udržení stabilního vnitřního prostředí buňky je klíčové pro mnoho buněčných procesů. Narušení buněčné homeostázy může vést k závažným patologickým projevům. Lidské a kvasničné isoformy antiporterů Na^+K^+/H^+ , které hrají v udržování intracelulární koncentrace alkalických kationtů významnou roli, se skládají z transmembránové části, která je primárně zodpovědná za transport kationtů a dlouhý cytoplasmatický C-konec, který může tvořit až 50% celkové délky proteinu.

V tomto projektu byla potvrzena interakce mezi kvasničným antiporterem $Nha1$ a proteiny 14-3-3 prostřednictvím regulačního C-konce. Kombinací metod strukturní biologie a experimenty provedených *in vivo* byla určena místa Ser481 a Ser479 jako klíčová pro interakci proteinů 14-3-3. Biofyzikálními metodami bylo potvrzeno, že cytoplasmatický C-

konec antiporteru Nha1 je nestrukturovaný, a po vazbě na proteiny 14-3-3 dochází ke snížení flexibility a výraznému strukturování C-konce Nha1.

Mutace Ser479 a Ser481 na alanin měla za následek rapidní zvýšení aktivity antiporteru. Předchozími studii byla prokázána aktivační role proteinů 14-3-3 v případě savčích variant antiporterů, konkrétně NHE (Lehoux et al., 2001). V případě kvasničného antiporteru na druhou stranu dochází ke snížení transportní aktivity po vazbě proteinů 14-3-3. Tyto rozdílné role u proteinů stejné rodiny jsou pravděpodobně dány různými fyziologickými rolemi členů této široké rodiny.

11 Souhrnná diskuze

Tato disertační práce je skládá ze tří na sobě nezávislých projektů. Každý projekt měl za cíl charakterizovat roli proteinů 14-3-3 v regulaci svého vazebného partnera, který je důležitý pro konkrétní signální dráhu nebo metabolický děj.

Prvním projektem byla strukturní charakterizace neutrální trehalasy 1 (Nth1) a jejího komplexu s proteinem 14-3-3. Tento komplex byl úspěšně vykrytalizován a následně byla vyřešena krystalová struktura s vysokým rozlišením. Na základě získaných dat byl odhalen unikátní mechanismus aktivace proteinem 14-3-3 na molekulární úrovni a byla zároveň identifikována konzervovaná místa Nth1 důležitá pro vlastní katalýzu.

Studium lidská isoforma prokaspasy-2 (proC2) bylo druhým projektem mé disertační práce. V tomto případě byla poprvé prokázána fosforylačně dependentní interakce prokaspasy-2 a proteinu 14-3-3 *in vitro*. Na základě těchto výsledků byl komplex proC2:14-3-3 strukturně charakterizován. Jedním z nejvýznamnějších výsledků je odhalení souvislosti mezi vazbou proteinu 14-3-3 a jaderné lokalizační sekvence mezi proC2 doménami CARD a p19, která je zodpovědná za transport kaspasy-2 do jádra.

Poslední částí disertační práce bylo studium kvasničné isoformy antiporteru $\text{Na}^+\text{K}^+/\text{H}^+$ (Nha1), jejíž transportní aktivita je také regulována interakcí s proteiny 14-3-3. V rámci tohoto projektu byl identifikován fosforylovaný Ser481 jako vazebný motiv pro proteiny 14-3-3. Zároveň byla navržena role proteinů 14-3-3 jako negativního regulátoru transportu kationtů prostřednictvím antiporteru Nha1.

Proteiny 14-3-3 interagují se širokou škálou proteinů, a tím ovlivňují mnoho metabolických a signálních drah. Tato disertační práce zkoumala tři velmi různorodé vazebné partnery 14-3-3, kdy u proteinů 14-3-3 byla prokázána aktivátoru enzymu (Nth1), inhibitoru maturace proteasy a její subcelulární lokalice (proC2) a negativního regulátoru transportu kationtů z cytoplasmatické membrány (antiporter Nha1).

12 Summary

This PhD thesis is composed of three independent projects. Each project aims to characterize 14-3-3 proteins in the regulation its binding partner, which is important for a particular signaling pathway or metabolic process.

The first project was structural characterization of neutral trehalase 1 (Nth1) alone and in the complex with 14-3-3 protein. This complex has been successfully crystallized and X-tal structure with high resolution was solved. Based on the data, the mechanism of Nth1 activation with 14-3-3 protein on the molecular level was revealed and conserved Nth1 sites important for catalysis were identified.

The study of the human procaspase-2 (proC2) was the second project of my thesis. In this case, the phosphorylation-dependent interaction of procaspase-2 and 14-3-3 protein *in vitro* was firstly demonstrated. Based on these results, the structure of the proC2:14-3-3 complex was characterized. One of the most important results was deciphering the connection between the 14-3-3 protein binding to proC2 and the nuclear localization sequence between the CARD and p19 domains of proC2, which is responsible for the transport of caspase-2 to the nucleus.

The last part of the thesis was the study of the yeast isoform of the $\text{Na}^+\text{K}^+/\text{H}^+$ antiporter Nha1, whose transport activity is regulated by interaction with 14-3-3 proteins. In this project, phosphorylated Ser481 was identified as a binding motif for the 14-3-3 proteins. Also, the role of the 14-3-3 proteins as a negative regulator of cation transport through the Nha1 antiporter has been proposed.

14-3-3 proteins interact with a wide variety of proteins that affect many metabolic and signaling pathways. In this thesis three diverse 14-3-3 binding partners were investigated, where 14-3-3 proteins have been shown to activate the enzyme Nth1, inhibit the maturation and localization of protease proC2, and negative regulate the cation transport of Nha1 antiporter.

13 Závěr

Hlavním cílem této disertační práce bylo studium mechanismu regulace různých vazebných partnerů proteinů 14-3-3: kvasničná neutrální trehalasa 1 (Nth1), lidská prokaspasa-2 (proC2) a kvasničný antiporter $\text{Na}^+\text{K}^+/\text{H}^+$ (Nha1). V rámci této disertační práce byly splněny dílčí cíle:

1. V publikaci č. 1 byl popsán mechanismus regulace kvasničné neutrální trehalasy 1 (Nth1) prostřednictvím proteinů 14-3-3

- Úspěšně vyřešená krystalová struktura fosforylované formy Nth1 WT v komplexu s kvasničným proteinem 14-3-3 s rozlišením 2,29 Å vedla k objasnění unikátního mechanismu alosterické regulace Nth1 vazbou proteinu 14-3-3. Stěžejním výsledkem publikace je první struktura proteinu 14-3-3 s multidoménovým plně aktivním enzymem, který pomohl odhalit roli jednotlivých domén a specifických sekvencí enzymu („lid loop“).

2. Publikace č. 2 a 3 obsahuje biofyzikální a strukturní charakterizaci komplexu prokaspasy-2 (proC2) a proteinu 14-3-3

- Pomocí analytické ultracentrifugace (AUC) byla potvrzena tvorba komplexu proC2₁₂₃₋₄₅₁ obsahující současně fosforylované Ser139 a Ser164 s proteinem 14-3-3 *in vitro* a určena stechiometrie vazby v poměru 1:2, kdy monomer proC2 se váže na dimer proteinu 14-3-3.
- Dále byly pomocí série fluorescenčních experimentů monitorující různé oblasti proC2 odhaleny strukturní změny v jednotlivých oblastech proC2 indukované vazbou proteinu 14-3-3 samotné a v komplexu s proteinem 14-3-3. Jaderná lokalizační sekvence (NLS), která spojuje domény CARD a p19 je blokována vazbou proteinu 14-3-3, která zároveň zamezuje oligomerizaci malé podjednotky p12.

3. V publikaci č. 4 byla identifikována důležitá vazebná místa intracelulárního C-konce antiporteru Nha1 a zároveň vliv kvasničného proteinu 14-3-3 na jeho aktivitu

- Nejprve byla připravena série serinových mutantních forem Nha1 WT pro *in vivo* stanovení tolerance k alkalickým solím na pevném médiu a měření transportu a

stanovení koncentrace alkalických kationtů v buňkách kvasinek. Výsledky těchto experimentů určily Ser479 a Ser481 jako možná vazebná místa pro protein 14-3-3.

- Měření afinity syntetických peptidů antiporteru Nha1 obsahující čtyři možné vazebné motivy pro proteiny 14-3-3 (Ser472, Ser479, Ser481 a Ser544) k proteinům Bmh1 a Bmh2 poukázalo na to, že pouze motivy obsahující Ser481 a potenciálně i Ser479 jsou zodpovědné za vazbu proteinu 14-3-3. Následná krystalizace proteinu Bmh1 Δ C s peptidem obsahující Ser481 vedla k úspěšnému vyřešení krystalové struktury s rozlišením 2,91 Å (PDB kód: 6QK8). Krystalová struktura ukázala na podobné kontakty peptidu Ser481 s vazebným žlábkem proteinu Bmh1 Δ C, které jsou podobné s již existujícími krystalovými strukturami proteinu 14-3-3, což potvrzuje klíčovou úlohu Ser481 jako 14-3-3 vazebného motivu.
- Kombinací metod SAXS, CD a AUC byla provedena strukturní charakterizace C-koncové části Nha1 samotné a po vazbě na protein 14-3-3. Konstrukt antiporteru Nha1⁴⁴⁰⁻⁵⁹⁶ je nestrukturovaný, ovšem komplex Nha1⁴⁴⁰⁻⁵⁹⁶:Bmh2 (molární poměr 1:2) je kompaktní, dochází tedy k významnému strukturování po vazbě proteinu 14-3-3.

14 Seznam použité literatury

- Albrecht, C., 2008. Joseph R. Lakowicz: Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd Edition. *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 1223–1224. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1822-x>
- Aleshin, A.E., Firsov, L.M., Honzatko, R.B., 1994. Refined structure for the complex of acarbose with glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. x100 to 2.4 angstroms resolution. (:unav). <https://doi.org/10.2210/pdb1agm/pdb>
- Amaral, F.C., Van Dijck, P., Nicoli, J.R., Thevelein, J.M., 1997. Molecular cloning of the neutral trehalase gene from *Kluyveromyces lactis* and the distinction between neutral and acid trehalases. *Arch. Microbiol.* 167, 202–208.
- Andersen, J.L., Thompson, J.W., Lindblom, K.R., Johnson, E.S., Yang, C.-S., Lilley, L.R., Freel, C.D., Moseley, M.A., Kornbluth, S., 2011. A Biotin Switch-Based Proteomics Approach Identifies 14-3-3 ζ as a Target of Sirt1 in the Metabolic Regulation of Caspase-2. *Mol. Cell* 43, 834–842. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.028>
- Aneta Šmídová, 2016. Přípava a charakterizace neutrální trehalasy pro strukturní studie, diplomová práce.
- Baliga, B.C., Colussi, P.A., Read, S.H., Dias, M.M., Jans, D.A., Kumar, S., 2003. Role of Prodomain in Importin-mediated Nuclear Localization and Activation of Caspase-2. *J. Biol. Chem.* 278, 4899–4905. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211512200>
- Bañuelos, M.A., Sychrová, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J.L., Potier, S., 1998. The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiol. Read. Engl.* 144 (Pt 10), 2749–2758. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-10-2749>
- Becker, A., Schlöder, P., Steele, J.E., Wegener, G., 1996. The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia* 52, 433–439.
- Berg, D., Holzmann, C., Riess, O., 2003. 14-3-3 proteins in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 752–762. <https://doi.org/10.1038/nrn1197>
- Bernadó, P., Svergun, D.I., 2012. Structural analysis of intrinsically disordered proteins by small-angle X-ray scattering. *Mol BioSyst* 8, 151–167. <https://doi.org/10.1039/C1MB05275F>
- Brett, C.L., Tukaye, D.N., Mukherjee, S., Rao, R., 2005. The yeast endosomal Na⁺K⁺/H⁺ exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Mol. Biol. Cell* 16, 1396–1405. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-11-0999>
- Donowitz, M., Ming Tse, C., Fuster, D., 2013. SLC9/NHE gene family, a plasma membrane and organellar family of Na⁺/H⁺ exchangers. *Mol. Aspects Med.* 34, 236–251. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.001>
- Dosztanyi, Z., Csizmok, V., Tompa, P., Simon, I., 2005. IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics* 21, 3433–3434. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti541>
- Duan, H., Dixit, V.M., 1997. RAIDD is a new “death” adaptor molecule. *Nature* 385, 86–89. <https://doi.org/10.1038/385086a0>
- Egloff, M.P., Uppenberg, J., Haalck, L., van Tilbeurgh, H., 2001. Crystal structure of maltose phosphorylase from *Lactobacillus brevis*: unexpected evolutionary relationship with glucoamylases. *Struct. Lond. Engl.* 1993 9, 689–697.
- Elbein, A.D., 1974. The metabolism of alpha,alpha-trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 30, 227–256.

- Fava, L.L., Bock, F.J., Geley, S., Villunger, A., 2012. Caspase-2 at a glance. *J. Cell Sci.* 125, 5911–5915. <https://doi.org/10.1242/jcs.115105>
- Freeman, A.K., Morrison, D.K., 2011. 14-3-3 Proteins: Diverse functions in cell proliferation and cancer progression. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 681–687. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.08.009>
- Galili, L., Herz, K., Dym, O., Padan, E., 2004. Unraveling Functional and Structural Interactions between Transmembrane Domains IV and XI of NhaA Na⁺/H⁺ Antiporter of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 279, 23104–23113. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400288200>
- Galili, L., Rothman, A., Kozachkov, L., Rimon, A., Padan, E., 2002. Trans Membrane Domain IV Is Involved in Ion Transport Activity and pH Regulation of the NhaA-Na⁺/H⁺ Antiporter of *Escherichia coli* †. *Biochemistry* 41, 609–617. <https://doi.org/10.1021/bi011655v>
- Gibson, R.P., Gloster, T.M., Roberts, S., Warren, R.A.J., Storch de Gracia, I., García, Á., Chiara, J.L., Davies, G.J., 2007. Molecular Basis for Trehalase Inhibition Revealed by the Structure of Trehalase in Complex with Potent Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, 4115–4119. <https://doi.org/10.1002/anie.200604825>
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G., 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274, 546, 563–567.
- Guss, J.M., 2011. Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology, by Bernard Rupp. *Crystallogr. Rev.* 17, 65–67. <https://doi.org/10.1080/08893111003621289>
- Hendus-Altenburger, R., Kragelund, B.B., Pedersen, S.F., 2014. Structural Dynamics and Regulation of the Mammalian SLC9A Family of Na⁺/H⁺ Exchangers, in: *Current Topics in Membranes*. Elsevier, pp. 69–148. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800223-0.00002-5>
- Hidaka, M., Honda, Y., Kitaoka, M., Nirasawa, S., Hayashi, K., Wakagi, T., Shoun, H., Fushinobu, S., 2004. Chitobiose Phosphorylase from *Vibrio proteolyticus*, a Member of Glycosyl Transferase Family 36, Has a Clan GH-L-like (α/α)₆ Barrel Fold. *Structure* 12, 937–947. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.03.027>
- Hottiger, T., Schmutz, P., Wiemken, A., 1987. Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 169, 5518–5522. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5518-5522.1987>
- Hunte, C., Screpanti, E., Venturi, M., Rimon, A., Padan, E., Michel, H., 2005. Structure of a Na⁺/H⁺ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH. *Nature* 435, 1197–1202. <https://doi.org/10.1038/nature03692>
- Johnson, C., Crowther, S., Stafford, M.J., Campbell, D.G., Toth, R., MacKintosh, C., 2010. Bioinformatic and experimental survey of 14-3-3-binding sites. *Biochem. J.* 427, 69–78. <https://doi.org/10.1042/BJ20091834>
- Kakiuchi, K., Yamauchi, Y., Taoka, M., Iwago, M., Fujita, T., Ito, T., Song, S.-Y., Sakai, A., Isobe, T., Ichimura, T., 2007. Proteomic analysis of in vivo 14-3-3 interactions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 46, 7781–7792. <https://doi.org/10.1021/bi700501t>
- Kamauchi, S., Mitsui, K., Ujike, S., Haga, M., Nakamura, N., Inoue, H., Sakajo, S., Ueda, M., Tanaka, A., Kanazawa, H., 2002. Structurally and functionally conserved domains in the diverse hydrophilic carboxy-terminal halves of various yeast and fungal Na⁺/H⁺ antiporters (Nha1p). *J. Biochem. (Tokyo)* 131, 821–831.

- Karlberg, T., Hornyak, P., Pinto, A.F., Milanova, S., Ebrahimi, M., Lindberg, M., Püllen, N., Nordström, A., Löverli, E., Caraballo, R., Wong, E.V., Näreoja, K., Thorsell, A.-G., Elofsson, M., De La Cruz, E.M., Björkegren, C., Schüler, H., 2018. 14-3-3 proteins activate *Pseudomonas* exotoxins-S and -T by chaperoning a hydrophobic surface. *Nat. Commun.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06194-1>
- Kinclová, O., Ramos, J., Potier, S., Sychrová, H., 2001. Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* Nha1p C-terminus. *Mol. Microbiol.* 40, 656–668.
- Kinclova-Zimmermannova, O., Sychrova, H., 2006. Functional study of the Nha1p C-terminus: involvement in cell response to changes in external osmolarity. *Curr. Genet.* 49, 229–236. <https://doi.org/10.1007/s00294-005-0050-1>
- Konarev, P.V., Petoukhov, M.V., Volkov, V.V., Svergun, D.I., 2006. *ATSAS 2.1*, a program package for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* 39, 277–286. <https://doi.org/10.1107/S0021889806004699>
- Konarev, P.V., Volkov, V.V., Sokolova, A.V., Koch, M.H.J., Svergun, D.I., 2003. *PRIMUS*: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* 36, 1277–1282. <https://doi.org/10.1107/S0021889803012779>
- Kopecka, M., Kosek, D., Kukacka, Z., Rezaczkova, L., Man, P., Novak, P., Obsil, T., Obsilova, V., 2014. Role of the EF-hand-like Motif in the 14-3-3 Protein-mediated Activation of Yeast Neutral Trehalase Nth1. *J. Biol. Chem.* 289, 13948–13961. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.544551>
- Kopp, M., Müller, H., Holzer, H., 1993. Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268, 4766–4774.
- Kostelecky, B., Saurin, A.T., Purkiss, A., Parker, P.J., McDonald, N.Q., 2009. Recognition of an intra-chain tandem 14-3-3 binding site within PKC ϵ . *EMBO Rep.* 10, 983–989. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.150>
- Krauke, Y., Sychrová, H., 2010. Chimeras between *C. glabrata* Cnh1 and *S. cerevisiae* Nha1 Na⁺/H⁺-antiporters are functional proteins increasing the salt tolerance of yeast cells. *Folia Microbiol. (Praha)* 55, 435–441. <https://doi.org/10.1007/s12223-010-0073-y>
- Krumschnabel, G., Manzl, C., Villunger, A., 2009. Caspase-2: killer, savior and safeguard—emerging versatile roles for an ill-defined caspase. *Oncogene* 28, 3093–3096. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.173>
- Kumar, S., 2009. Caspase 2 in apoptosis, the DNA damage response and tumour suppression: enigma no more? *Nat. Rev. Cancer* 9, 897–903. <https://doi.org/10.1038/nrc2745>
- Lee, C., Kang, H.J., von Ballmoos, C., Newstead, S., Uzdavinyis, P., Dotson, D.L., Iwata, S., Beckstein, O., Cameron, A.D., Drew, D., 2013. A two-domain elevator mechanism for sodium/proton antiport. *Nature* 501, 573.
- Lehoux, S., Abe, J., Florian, J.A., Berk, B.C., 2001. 14-3-3 Binding to Na⁺/H⁺ Exchanger Isoform-1 Is Associated with Serum-dependent Activation of Na⁺/H⁺ Exchange. *J. Biol. Chem.* 276, 15794–15800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100410200>
- Li, J., Yuan, J., 2008. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27, 6194–6206. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.297>
- Liu, D., Bienkowska, J., Petosa, C., Collier, R.J., Fu, H., Liddington, R., 1995. Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature* 376, 191–194. <https://doi.org/10.1038/376191a0>
- Macakova, E., Kopecka, M., Kukacka, Z., Veisova, D., Novak, P., Man, P., Obsil, T., Obsilova, V., 2013. Structural basis of the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1830, 4491–4499. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.025>

- Maris, A.E., Walthers, D., Mattison, K., Byers, N., Kenney, L.J., 2005. The Response Regulator OmpR Oligomerizes via β -Sheets to Form Head-to-head Dimers. *J. Mol. Biol.* 350, 843–856. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.05.057>
- Masone, D., Uhart, M., Bustos, D.M., 2017. On the role of residue phosphorylation in 14-3-3 partners: AANAT as a case study. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/srep46114>
- Mittenbühler, K., Holzer, H., 1988. Purification and characterization of acid trehalase from the yeast *suc2* mutant. *J. Biol. Chem.* 263, 8537–8543.
- Moerke, N.J., 2009. Fluorescence Polarization (FP) Assays for Monitoring Peptide-Protein or Nucleic Acid-Protein Binding, in: Arkin, A.P., Mahal, L., Romesberg, F., Shah, K., Shamu, C., Thomas, C. (Eds.), *Current Protocols in Chemical Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. <https://doi.org/10.1002/9780470559277.ch090102>
- Moore BW, Perez VJ, n.d. Specific acidic proteins of the nervous system, in: *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration*. Prentice Hall/Woods Hole, Woods Hole, MA, USA, pp. 343–359.
- Muslin, A.J., Xing, H., 2000. 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell. Signal.* 12, 703–709.
- Mymrikov, E.V., Seit-Nebi, A.S., Gusev, N.B., 2011. Large Potentials of Small Heat Shock Proteins. *Physiol. Rev.* 91, 1123–1159. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2010>
- Nass, R., Rao, R., 1998. Novel localization of a Na⁺/H⁺ exchanger in a late endosomal compartment of yeast. Implications for vacuole biogenesis. *J. Biol. Chem.* 273, 21054–21060.
- Niesen, F.H., Berglund, H., Vedadi, M., 2007. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat. Protoc.* 2, 2212–2221. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.321>
- Nutt, L.K., Buchakjian, M.R., Gan, E., Darbandi, R., Yoon, S.-Y., Wu, J.Q., Miyamoto, Y.J., Gibbon, J.A., Andersen, J.L., Freel, C.D., Tang, W., He, C., Kurokawa, M., Wang, Y., Margolis, S.S., Fissore, R.A., Kornbluth, S., 2009. Metabolic Control of Oocyte Apoptosis Mediated by 14-3-3 ζ -Regulated Dephosphorylation of Caspase-2. *Dev. Cell* 16, 856–866. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.04.005>
- Nutt, L.K., Margolis, S.S., Jensen, M., Herman, C.E., Dunphy, W.G., Rathmell, J.C., Kornbluth, S., 2005. Metabolic Regulation of Oocyte Cell Death through the CaMKII-Mediated Phosphorylation of Caspase-2. *Cell* 123, 89–103. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.032>
- Nwaka, S., Holzer, H., 1998. Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 58, 197–237.
- Nwaka, S., Mechler, B., Destruelle, M., Holzer, H., 1995. Phenotypic features of trehalase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 360, 286–290.
- Nwaka, S., Mechler, B., Holzer, H., 1996. Deletion of the ATH1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* prevents growth on trehalose. *FEBS Lett.* 386, 235–238.
- Obradovic, Z., Peng, K., Vucetic, S., Radivojac, P., Brown, C.J., Dunker, A.K., 2003. Predicting intrinsic disorder from amino acid sequence. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 53, 566–572. <https://doi.org/10.1002/prot.10532>
- Obsil, T., Ghirlando, R., Klein, D.C., Ganguly, S., Dyda, F., 2001. Crystal structure of the 14-3-3 ζ :serotonin N-acetyltransferase complex. a role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell* 105, 257–267.
- Obsil, T., Obsilova, V., 2011. Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 663–672. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.09.001>

- Obsilova, V., Herman, P., Vecer, J., Sulc, M., Teisinger, J., Obsil, T., 2004. 14-3-3 ζ C-terminal Stretch Changes Its Conformation upon Ligand Binding and Phosphorylation at Thr²³². *J. Biol. Chem.* 279, 4531–4540. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306939200>
- Obsilová, V., Silhan, J., Boura, E., Teisinger, J., Obsil, T., 2008. 14-3-3 proteins: a family of versatile molecular regulators. *Physiol. Res.* 57 Suppl 3, S11-21.
- Orlowski, J., Grinstein, S., 2004. Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch.* 447, 549–565. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1110-3>
- Ottmann, C., Marco, S., Jaspert, N., Marcon, C., Schauer, N., Weyand, M., Vandermeeren, C., Duby, G., Boutry, M., Wittinghofer, A., Rigaud, J.-L., Oecking, C., 2007. Structure of a 14-3-3 Coordinated Hexamer of the Plant Plasma Membrane H⁺-ATPase by Combining X-Ray Crystallography and Electron Cryomicroscopy. *Mol. Cell* 25, 427–440. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.12.017>
- Panni, S., Landgraf, C., Volkmer-Engert, R., Cesareni, G., Castagnoli, L., 2008. Role of 14-3-3 proteins in the regulation of neutral trehalase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 8, 53–63. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00312.x>
- Paulino, C., Wöhlert, D., Kapotova, E., Yildiz, Ö., Kühlbrandt, W., 2014. Structure and transport mechanism of the sodium/proton antiporter MjNhaP1. *eLife* 3. <https://doi.org/10.7554/eLife.03583>
- Pop, C., Salvesen, G.S., 2009. Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation. *J. Biol. Chem.* 284, 21777–21781. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800084200>
- Posas, F., Chambers, J.R., Heyman, J.A., Hoeffler, J.P., de Nadal, E., Ariño, J., 2000. The transcriptional response of yeast to saline stress. *J. Biol. Chem.* 275, 17249–17255. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910016199>
- Pribylová, L., Papoušková, K., Zavrel, M., Souciet, J.L., Sychrová, H., 2006. Exploration of yeast alkali metal cation/H⁺ antiporters: sequence and structure comparison. *Folia Microbiol. (Praha)* 51, 413–424.
- Prior, C., Potier, S., Souciet, J.L., Sychrova, H., 1996. Characterization of the NHA1 gene encoding a Na⁺/H⁺-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 387, 89–93.
- Rashidi, H.H., Bauer, M., Patterson, J., Smith, D.W., 1999. Sequence motifs determine structure and Ca⁺⁺-binding by EF-hand proteins. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1, 175–182.
- Ren, K., Lu, J., Porollo, A., Du, C., 2012. Tumor-suppressing Function of Caspase-2 Requires Catalytic Site Cys-320 and Site Ser-139 in Mice. *J. Biol. Chem.* 287, 14792–14802. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.347625>
- Rimon, A., Tzuberly, T., Padan, E., 2007. Monomers of the NhaA Na⁺/H⁺ Antiporter of *Escherichia coli* Are Fully Functional yet Dimers Are Beneficial under Extreme Stress Conditions at Alkaline pH in the Presence of Na⁺ or Li⁺. *J. Biol. Chem.* 282, 26810–26821. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704469200>
- Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L.C., Smerdon, S.J., Gamblin, S.J., Yaffe, M.B., 1999. Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Mol. Cell* 4, 153–166.
- Rodríguez-Navarro, A., 2000. Potassium transport in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1469, 1–30.
- Rodríguez-Navarro, A., Ramos, J., 1984. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 159, 940–945.

- Rosenquist, M., 2001. Data Mining the Arabidopsis Genome Reveals Fifteen 14-3-3 Genes. Expression Is Demonstrated for Two out of Five Novel Genes. *PLANT Physiol.* 127, 142–149. <https://doi.org/10.1104/pp.127.1.142>
- Schweizer, A., Briand, C., Grütter, M.G., 2003. Crystal Structure of Caspase-2, Apical Initiator of the Intrinsic Apoptotic Pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 42441–42447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304895200>
- Serrano, A., Pérez-Castañeira, J., Baltscheffsky, M., Baltscheffsky, H., 2007. H⁺-PPases: yesterday, today and tomorrow. *IUBMB Life* 59, 76–83. <https://doi.org/10.1080/15216540701258132>
- Shattock, M.J., Ottolia, M., Bers, D.M., Blaustein, M.P., Boguslavskiy, A., Bossuyt, J., Bridge, J.H.B., Chen-Izu, Y., Clancy, C.E., Edwards, A., Goldhaber, J., Kaplan, J., Lingrel, J.B., Pavlovic, D., Philipson, K., Sipido, K.R., Xie, Z.-J., 2015. Na⁺/Ca²⁺ exchange and Na⁺/K⁺-ATPase in the heart. *J. Physiol.* 593, 1361–1382. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.282319>
- Shin, S., Lee, Y., Kim, W., Ko, H., Choi, H., Kim, K., 2005. Caspase-2 primes cancer cells for TRAIL-mediated apoptosis by processing procaspase-8. *EMBO J.* 24, 3532–3542. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600827>
- Silhan, J., Obsilova, V., Vecer, J., Herman, P., Sulc, M., Teisinger, J., Obsil, T., 2004. 14-3-3 Protein C-terminal Stretch Occupies Ligand Binding Groove and Is Displaced by Phosphopeptide Binding. *J. Biol. Chem.* 279, 49113–49119. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408671200>
- Simón, E., Barceló, A., Ariño, J., 2003. Mutagenesis analysis of the yeast Nha1 Na⁺/H⁺ antiporter carboxy-terminal tail reveals residues required for function in cell cycle. *FEBS Lett.* 545, 239–245.
- Sluchanko, N.N., 2018. Association of Multiple Phosphorylated Proteins with the 14-3-3 Regulatory Hubs: Problems and Perspectives. *J. Mol. Biol.* 430, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.11.010>
- Sluchanko, N.N., Beelen, S., Kulikova, A.A., Weeks, S.D., Antson, A.A., Gusev, N.B., Strelkov, S.V., 2017. Structural Basis for the Interaction of a Human Small Heat Shock Protein with the 14-3-3 Universal Signaling Regulator. *Structure* 25, 305–316. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.12.005>
- Soong, T.W., Yong, T.F., Ramanan, N., Wang, Y., 2000. The *Candida albicans* antiporter gene CNH1 has a role in Na⁺ and H⁺ transport, salt tolerance, and morphogenesis. *Microbiol. Read. Engl.* 146 (Pt 5), 1035–1044. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-5-1035>
- Stanger, B.Z., Leder, P., Lee, T.H., Kim, E., Seed, B., 1995. RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* 81, 513–523.
- Svergun, D.I., 1992. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Crystallogr.* 25, 495–503. <https://doi.org/10.1107/S0021889892001663>
- Taoka, K., Ohki, I., Tsuji, H., Furuita, K., Hayashi, K., Yanase, T., Yamaguchi, M., Nakashima, C., Purwestri, Y.A., Tamaki, S., Ogaki, Y., Shimada, C., Nakagawa, A., Kojima, C., Shimamoto, K., 2011. 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. *Nature* 476, 332–335. <https://doi.org/10.1038/nature10272>
- Taoka, K., Ohki, I., Tsuji, H., Kojima, C., Shimamoto, K., 2013. Structure and function of florigen and the receptor complex. *Trends Plant Sci.* 18, 287–294. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.02.002>

- Thornberry, N.A., Miller, D.K., Nicholson, D.W., 1995. Interleukin-1 β -converting enzyme and related proteases as potential targets in inflammation and apoptosis. *Perspect. Drug Discov. Des.* 2, 389–399. <https://doi.org/10.1007/BF02172032>
- Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., Chapman, K.T., Nicholson, D.W., 1997. A Combinatorial Approach Defines Specificities of Members of the Caspase Family and Granzyme B: FUNCTIONAL RELATIONSHIPS ESTABLISHED FOR KEY MEDIATORS OF APOPTOSIS. *J. Biol. Chem.* 272, 17907–17911. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.29.17907>
- Tinel, A., 2004. The PIDDosome, a Protein Complex Implicated in Activation of Caspase-2 in Response to Genotoxic Stress. *Science* 304, 843–846. <https://doi.org/10.1126/science.1095432>
- Tinti, M., Madeira, F., Murugesan, G., Hoxhaj, G., Toth, R., MacKintosh, C., 2014. ANIA: ANnotation and Integrated Analysis of the 14-3-3 interactome. *Database* 2014. <https://doi.org/10.1093/database/bat085>
- van Hemert, M.J., Steensma, H.Y., van Heusden, G.P.H., 2001. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *BioEssays* 23, 936–946. <https://doi.org/10.1002/bies.1134>
- van Heusden, G.P., Griffiths, D.J., Ford, J.C., Chin-A-Woeng, T.F., Schrader, P.A., Carr, A.M., Steensma, H.Y., 1995. The 14-3-3 proteins encoded by the BMH1 and BMH2 genes are essential in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and can be replaced by a plant homologue. *Eur. J. Biochem.* 229, 45–53.
- van Heusden, G.P.H., 2009. 14-3-3 Proteins: insights from genome-wide studies in yeast. *Genomics* 94, 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2009.07.004>
- Vecer, J., Herman, P., 2011. Maximum entropy analysis of analytically simulated complex fluorescence decays. *J. Fluoresc.* 21, 873–881. <https://doi.org/10.1007/s10895-009-0589-1>
- Veisova, D., Macakova, E., Rezaczkova, L., Sulc, M., Vacha, P., Sychrova, H., Obsil, T., Obsilova, V., 2012. Role of individual phosphorylation sites for the 14-3-3-protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. *Biochem. J.* 443, 663–670. <https://doi.org/10.1042/BJ20111615>
- Veisova, D., Rezaczkova, L., Stepanek, M., Novotna, P., Herman, P., Vecer, J., Obsil, T., Obsilova, V., 2010. The C-terminal segment of yeast BMH proteins exhibits different structure compared to other 14-3-3 protein isoforms. *Biochemistry* 49, 3853–3861. <https://doi.org/10.1021/bi100273k>
- Wang, W., Shakes, D.C., 1996. Molecular evolution of the 14-3-3 protein family. *J. Mol. Evol.* 43, 384–398.
- Ward, J.J., Sodhi, J.S., McGuffin, L.J., Buxton, B.F., Jones, D.T., 2004. Prediction and Functional Analysis of Native Disorder in Proteins from the Three Kingdoms of Life. *J. Mol. Biol.* 337, 635–645. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.02.002>
- Wilker, E.W., Grant, R.A., Artim, S.C., Yaffe, M.B., 2005. A structural basis for 14-3-3sigma functional specificity. *J. Biol. Chem.* 280, 18891–18898. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500982200>
- Wöhlert, D., Kühlbrandt, W., Yildiz, Ö., 2014. Structure and substrate ion binding in the sodium/proton antiporter PaNhaP. *eLife* 3. <https://doi.org/10.7554/eLife.03579>
- Xiao, B., Smerdon, S.J., Jones, D.H., Dodson, G.G., Soneji, Y., Aitken, A., Gamblin, S.J., 1995. Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. *Nature* 376, 188–191. <https://doi.org/10.1038/376188a0>

- Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J., Cantley, L.C., 1997. The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* 91, 961–971.
- Yang, X., Lee, W.H., Sobott, F., Papagrigoriou, E., Robinson, C.V., Grossmann, J.G., Sundstrom, M., Doyle, D.A., Elkins, J.M., 2006. Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 17237–17242. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605779103>
- Yoshikawa, K., Tanaka, T., Furusawa, C., Nagahisa, K., Hirasawa, T., Shimizu, H., 2009. Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 9, 32–44. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00456.x>
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., Horvitz, H.R., 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641–652.
- Zahrádka, J., van Heusden, G.P.H., Sychrová, H., 2012. Yeast 14-3-3 proteins participate in the regulation of cell cation homeostasis via interaction with Nha1 alkali-metal-cation/proton antiporter. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1820, 849–858. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.03.013>
- Zähringer, H., Burgert, M., Holzer, H., Nwaka, S., 1997. Neutral trehalase Nth1p of *Saccharomyces cerevisiae* encoded by the NTH1 gene is a multiple stress responsive protein. *FEBS Lett.* 412, 615–620.

15 Seznam příloh

Příloha 1

ALBLOVA M, **SMIDOVA A**, DOCEKAL V, VESELY J, HERMAN P, OBSILOVA V, OBSIL T. (2017) Molecular basis of the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **114**:E9811-E9820

Příloha 2

KALABOVA D, **SMIDOVA A**, PETRVALSKA O, ALBLOVA M, KOSEK D, MAN P, OBSIL T, OBSILOVA V. (2017) Human procaspase-2 phosphorylation at both S139 and S164 is required for 14-3-3 binding. *Biochem Biophys Res Commun.* **493**:940-945.

Příloha 3

SMIDOVA A, ALBLOVA M, KALABOVA D, PSENAKOVA K, ROSULEK M, HERMAN P, OBSIL T, OBSILOVA V. (2018) 14-3-3 protein masks the nuclear localization sequence of caspase-2. *FEBS J.* **285**:4196-4213.

Příloha 4

ALBLOVA M, **SMIDOVA A**, KALABOVA D, LENTINI SANTO D, OBSIL T, OBSILOVA V. (2019) Allosteric activation of yeast enzyme neutral trehalase by calcium and 14-3-3 protein. *Physiol Res.* **68**:147-160.

Příloha 5

SMIDOVA A, STANKOVA K, PETRVALSKA O, LAZAR J, SYCHROVA H, OBSIL T, ZIMMERMANNNOVA O, OBSILOVA V. (2019) The activity of *Saccharomyces cerevisiae* Na⁺, K⁺/H⁺ antiporter Nha1 is negatively regulated by 14-3-3 protein binding at serine 481. *Zasláno do časopisu.*