

UNIVERZITA KARLOVA

2. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



**Molekulární mechanismus regulace funkce kaspasy-2
pomocí proteinů 14-3-3**

**Molecular mechanism of 14-3-3 protein dependent regulation
of caspase-2**

Dana Kalábová

Praha, 2023

Disertační práce byla vypracována v rámci *kombinovaného* studia doktorského studijního programu *Biochemie a patobiochemie* ve *Fyziologickém ústavu AV ČR* a na *2. lékařské fakultě Univerzity Karlovy*.

Školitel: *RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D., Fyziologický ústav AV ČR*

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby oborové rady

Biochemie a patobiochemie

dne v od hod.

Předsedou komise pro obhajobu disertační práce byl jmenován:

.....

Předseda oborové rady a garant doktorského studijního programu:

prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.

Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN

Děkan fakulty: *prof. MUDr. Marek Babjuk, CSc.*

Tato práce vznikla za podpory grantu:

Grantové agentury České republiky, projekt číslo 17-00726S

Grantové agentury Univerzity Karlovy, projekt číslo 296216

Grantové agentury České republiky, projekt číslo 16-02739S

S disertační prací je možno se seznámit na Oddělení Ph.D. studia děkanátu 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 (tel. 224 435 836).

Molekulární mechanismus regulace funkce kaspasy-2 pomocí proteinů 14-3-3

Abstrakt

Kaspasa-2 je proteasa stojící apikálně v kaskádě dějů vedoucích k apoptose. Správně vedený proces apoptosy likviduje poškozené buňky, autoreaktivní lymfocyty či nadbytečné skupiny buněk v ontogenezi. Proces aktivace kaspasy-2 musí být přesně regulovaný. Jedním z popsaných způsobů regulace kaspasy-2 způsobující její inhibici je posttranslační modifikace fosforylace spojená s následnou vazbou regulačního skafoldového proteinu 14-3-3. Cílem disertační práce je vysvětlit molekulární mechanismus této regulace. Pro porozumění interakce mezi proteiny bylo nezbytné nejprve určit fosforylační místa v molekule kaspasy-2 rozpoznávaná proteinem 14-3-3 a poté popsat detailní strukturu vazebného komplexu. Struktura byla popsána řadou biochemických a biofyzikálních metod, jako je analytická centrifugace, nativní elektroforesa v TBE pufru, polarizačně fluorescenční esej, vodík/deuteriová výměna spojená s hmotnostní spektrometrií či krystalizace, a výsledky vedly k podnětným závěrům. Aktivace kaspasy-2 začíná její vazbou na adaptorové proteiny, štěpením a dimerizací katalytických podjednotek. Z výsledků vyplynulo, že protein 14-3-3 může svou vazbou inhibovat aktivaci kaspasy-2 skrze blokování sekvencí nezbytných pro dimerizaci a/nebo vazbu adaptorových proteinů. Druhým možným způsobem inhibice je překrytí jaderné lokalizační sekvence kaspasy-2 a v důsledku toho vliv na translokaci kaspasy-2 do jádra buňky, kde se jako jediná z kaspas za určitých podmínek aktivuje.

Klíčová slova

kaspasa-2, prokaspasa-2, 14-3-3, protein-proteinová interakce, fosforylace, jaderná lokalizační sekvence, apoptosa

Molecular mechanism of 14-3-3 protein dependent regulation of caspase-2

Abstract

Caspase-2 is a protease standing apically in the cascade of reactions leading to apoptosis. Properly functional apoptosis eliminates damaged cells, autoreactive lymphocytes or redundant groups of cells in ontogeny. The process of caspase-2 activation must be precisely regulated. One of the described ways of caspase-2 regulation causing its inhibition is posttranslational modification phosphorylation with subsequent binding of the regulatory scaffold protein 14-3-3. The aim of this dissertation is to explain the molecular mechanism of this regulation. To understand the interaction between the proteins, it was necessary to first identify the phosphorylation sites in the caspase-2 molecule recognized by the 14-3-3 protein and then describe the detailed structure of the binding complex. The structure was characterized by a number of biochemical and biophysical methods, such as analytical ultracentrifugation, native electrophoresis in TBE buffer, polarization-fluorescence assay, hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry, or crystallization; and the results led to stimulating conclusions. Activation of caspase-2 begins with its binding to adaptor proteins, cleavage and dimerization of the catalytic subunits. The results showed that the 14-3-3 protein can inhibit caspase-2 activation by sterically occluding of sequences necessary for dimerization and/or binding of adaptor proteins. A second possible mode of inhibition is the overlapping of the nucleation localization sequence of caspase-2 and, as a consequence, the effect on the translocation of caspase-2 into the cell nucleus, where it is the only caspase to be activated under certain conditions.

Keywords

caspase-2, procaspase-2, 14-3-3, protein-protein interaction, phosphorylation, nuclear localization sequence, apoptosis

Obsah

1. Úvod do problematiky.....	7
2. Cíle práce.....	10
3. Metodika.....	11
3.1. Exprese a purifikace proteinů prokaspasy-2, 14-3-3 a CaMKK2.....	11
3.2. AUC.....	11
3.3. Fluorescenčně polarizační esej.....	11
3.4. Analytická gelová permeační chromatografie.....	12
3.5. Nativní elektroforesa.....	12
3.6. Limitovaná proteolýza.....	12
3.7. Vodík/deuteriová výměna (H/D výměna) spojená s hmotnostní spektrometrií.....	12
3.8. Krystalografie.....	13
4. Výsledky.....	14
4.1. Charakterizace vazby prokaspasy-2 (dp) s proteinem 14-3-3 ζ a 14-3-3 γ ... 14	
4.1.1. Vazebná místa Ser ¹³⁹ a Ser ¹⁶⁴ pro vazbu prokaspasy-2 (dp) a 14-3-3 ζ mají různou vazebnou afinitu.....	14
4.1.2. Dvojitě fosforylovaná kaspasa-2 spolu s dimerem proteinu 14-3-3 ζ tvoří stabilní komplex.....	14
4.1.3. Pro vytvoření stabilního komplexu mezi proteiny prokaspasy-2 (dp) a dimerem proteinu 14-3-3 ζ je nutná přítomnost obou fosforylovaných vazebných motivů.....	16
4.1.4. Vazba dimeru 14-3-3 ζ chrání prokaspasu-2 před proteolytickou degradací <i>in vitro</i>	17
4.1.5. 14-3-3 γ interaguje v komplexu s prokaspasou-2 (dp) s C-terminální částí její domény p12, která je zapojena do dimerizace kaspasové molekuly 18	
4.1.6. Krystalová struktura komplexu 14-3-3 $\gamma\Delta$ C s dvojitě fosforylovaným peptidem prokaspasy-2 pS ¹³⁹ +pS ¹⁶⁴	18
4.2. Charakterizace vazby CaMKK2 s proteinem 14-3-3 γ	19
5. Diskuse.....	20
6. Závěr.....	24
7. Souhrn.....	27
8. Summary.....	28
9. Literatura.....	29

1. Úvod do problematiky

Apoptosa je geneticky programovaná buněčná smrt. Je součástí tkáňové homeostasy – vyváženého vzniku a zániku buněk. Jejím cílem je eliminovat individuální buňky v organismu bez poškození struktury okolní tkáně. S apoptosou je spjata klíčová úloha kaspas (Alnemri et al., 1996; Cerretti et al., 1992; Liu et al., 1996; Nicholson et al., 1995; Thornberry and Lazebnik, 1998). Kaspasy jsou endoproteasy s cysteinem ve svém aktivním místě, které štěpí peptidové vazby specificky za aspartátem (z angl. cysteinyl aspartate specific protease). Štěpí celou řadu proteinů v přesně řízených signálních drahách, které vedou k rozkladu buňky určené k zániku. Kaspasy jsou v buňkách syntetizovány jako zymogeny postrádající jakoukoliv proteasovou aktivitu a setrvávající neaktivní až do obdržení specifického stimulu (Earnshaw et al., 1999). Aktivace a aktivita kaspas podléhá jemně a striktně řízené regulaci.

Kaspasa-2 byla objevena a popsána jako jedna z prvních savčích kaspas a její sekvence je evolučně nejvíce zakonzervována (Kumar et al., 1994; Wang et al., 1994). Její úloha v apoptose byla popsána v návaznosti na různé signální dráhy, například vnitřní dráhu aktivace apoptosy přes p53 (Lassus et al., 2002), apoptosu indukovanou reaktivními formami kyslíku (ROS, z angl. reactive oxygen species) (Braga et al., 2008), stres endoplasmatického retikula (Gu et al., 2008), dráhu apoptosy indukovanou proteinem TRAIL (Shin et al., 2005) a také v programované buněčné smrti neuronů (Madden and Cotter, 2008) a oocytů (Nutt et al., 2005). Kaspasa-2 je důležitým enzymem v regulaci buněčného cyklu (Connolly et al., 2020).

Kaspasa-2 je stejně jako ostatní kaspasy v organismu přítomna ve formě neaktivního proenzymu (prokaspasa-2), který obsahuje na N-konci CARD prodoménu, následuje velká p19 a malá p12 katalytická podjednotka. Proenzym kaspasy-2 je aktivován vazbou na vysokomolekulární komplex složený z adaptorových proteinů. Při aktivaci enzymu dojde k dimerizaci molekul a

autoproteolýze, je odstraněna prodoména a linkery mezi doménami. Maturovaná aktivní kaspasa-2 je heterodimer složený ze dvou p19 a dvou p12 katalytických podjednotek. Vazbu na adaptorové proteiny ovlivňuje posttranslační modifikace molekuly prokaspasy-2 a vazba dalších regulačních molekul.

Kaspasa-2 byla lokalizována v jádře, cytoplasmě a v Golgiho aparátu (Baliga et al., 2003; Mancini et al., 2000). Přechod kaspasy-2 z cytoplasmy do jádra je řízen jadernou lokalizační sekvencí (NLS, z angl. nuclear localization sequence), která se nachází v linkeru mezi doménami CARD a p19. Dle dřívějších výzkumů se soudilo, že k aktivaci kaspasy-2 dochází pouze v cytoplasmě (Tinnikov and Samuels, 2013). Nedávné výzkumy však ukázaly, že k aktivaci kaspasy-2 dochází také v jádru. Autoři práce ukázali, že látky způsobující poškození DNA aktivovaly kaspasu-2 v jádru, ostatní stresové podněty (heat shock, mikrotubulární inhibitor vinkristin apod.) vedly k aktivaci kaspasy-2 v cytoplasmě (Ando et al., 2017).

Tato disertační práce se zaměřuje na studium inhibiční vazby regulačního proteinu 14-3-3 k molekule prokaspasy-2. Vazba byla popsána v závislosti na nutriční bilanci buňky – na hladině NADPH, produktu pentosofosfátového cyklu. Dostatečná či zvýšená hladina NADPH v buňce vede k fosforylaci prokaspasy-2 na aminokyselinovém reziduu Ser¹³⁵ (u *Xenopus laevis*) či Ser¹⁶⁴ (u *Mus musculus*) a vazbě regulačního proteinu 14-3-3, který blokuje prokaspasu-2 v inaktivní nematurované formě. Při poklesu hladiny NADPH je 14-3-3 uvolněno z vazby s prokaspasou-2 a fosforylovaný serin je defosforylován proteinfosfatou 1 (PP1). Proenzym kaspasy-2 je tak přístupný pro vazbu s adaptorovými proteiny a následnou aktivaci. Tento mechanismus byl objasněn v apoptose oocytů během ontogeneze u *Xenopus laevis* a později také u myši (Nutt et al., 2009, 2005), nebyl však dosud popsán u člověka.

Mezi proteiny, u nichž byla prokázána regulace zprostředkovaná 14-3-3, patří také mnohé proteinkinasy. Kalcium/kalmodulin (Ca²⁺/CaM)-dependentní kiny (CaMK), je rodina serin/threoninových kinas, která zesiluje signály Ca²⁺ prostřednictvím řady následných fosforylačních kaskád. Naše studium se zaměřilo

na objasnění molekulární podstaty regulace $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -dependentní proteinkinasy kinasy 2 (CaMKK2) prostřednictvím 14-3-3. Protein 14-3-3 může regulovat aktivitu kinasy CaMKK2 buď přímo strukturální změnou katalytického místa, ale také vytěsněním $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ z vazebné domény CaM, blokováním defosforylace inhibičního místa nebo stabilizací interakce mezi autoinhibiční doménou a katalytickou doménou.

2. Cíle práce

Cílem disertační práce bylo porozumět molekulárnímu mechanismu inhibice lidské kaspasy-2 prostřednictvím proteinu 14-3-3. Pro porozumění interakce mezi dvěma proteiny je nejprve potřeba znát jejich strukturu a poté poznat strukturní změny, kterými molekula prochází po vytvoření komplexu s vazebným partnerem.

Specifickými cíli bylo:

1. Příprava stabilní a solubilní formy prokaspasy-2.
2. Příprava mutantních forem prokaspasy-2. Příprava fosforylované prokaspasy-2.
3. Identifikace fosforylačních míst v molekule prokaspasy-2 pro vazbu proteinu 14-3-3 použitím cílené mutagenese, nativní elektroforézy, analytické ultracentrifugace a hmotnostní spektrometrie.
4. Biofyzikální charakterizace interakce mezi fosforylovanou prokaspasou-2 a proteinem 14-3-3 pomocí biofyzikálních metod jako je analytická ultracentrifugace, analytická gelová permeační chromatografie, limitovaná proteolýza, fluorescenčně polarizační esej, CD spektrometrie či malouhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS).
5. Sledování strukturních změn v molekulách prokaspasy-2 a 14-3-3 po vytvoření komplexu pomocí H/D výměny spojené s hmotnostní spektrometrií.
6. Krystalizace proteinu 14-3-3 s fosfopeptidem prokaspasy-2 zahrnujícím ve své sekvenci prokázaná vazebná místa.
7. Posouzení výsledků práce a vyslovení principu mechanismu inhibice lidské prokaspasy-2 prostřednictvím proteinu 14-3-3 na základě poznání charakteru jejich protein-proteinové interakce.

3. Metodika

3.1. Exprese a purifikace proteinů prokaspasy-2, 14-3-3 a CaMKK2

Gen pro prokaspasu-2 byl zaklonován do expresního vektoru pST39, isoformy 14-3-3 do modifikovaného vektoru pET-15b s místem pro TEV proteasu namísto thrombinu a CaMKK2 do modifikovaného expresního vektoru pRSFDuet-1. Mutace byly vneseny metodou cílené mutageneze.

Prokaspasa-2, 14-3-3 a CaMKK2 byly exprimovány jako fúzní proteiny s polyhistidinovými kotvami v buňkách *E. coli* BL21 (DE3) s indukcí pomocí IPTG. Prvním purifikačním krokem u všech proteinů byla niklová afinitní chromatografie zakončená dialýzou pro odstranění vysoké koncentrace imidazolu. Následovala iontově výměnná chromatografie, případně odštěpení histidinové kotvy pomocí TEV proteasy. Posledním krokem byla gelová permeační chromatografie. Čistota proteinů byla kontrolována pomocí elektroforesy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE). Proteiny prokaspasa-2 a CaMKK2 byly fosforylovány proteinkinasou A (PKA) a výsledek fosforylace byl ověřen metodou hmotnostní spektrometrie.

3.2. AUC

Metodu sedimentační rychlosti analytické ultracentrifugace (SV AUC, z angl. sedimentation velocity analytical ultracentrifugation) jsme použili ke stanovení oligomerního stavu proteinu prokaspasy-2 a pro studium reverzibilních interakcí prokaspasy-2 s proteinem 14-3-3 včetně určení stechiometrie komplexu a výpočtu vazebné afinity charakterizované zdánlivou disociační konstantou K_D .

3.3. Fluorescenčně polarizační esej

Měření polarizace fluorescence poskytuje informace o orientaci a pohyblivosti molekul a procesech s tím spojených. Fluorescenčně polarizační esej je založena na principu fotoselektivní excitace molekul fluoroforů polarizovaným

elektromagnetickým zářením v opticky izotropním vzorku. V našem experimentu byly fluoroforem peptidy prokaspasy-2 obsahující kombinaci fosforylovaných vazebných míst pro protein 14-3-3, označené na N-konci fluorescenčním markerem FITC (z angl. fluorescein isothiocyanate). K peptidu o konstantní koncentraci bylo titrováno zvyšující se množství proteinu 14-3-3 ζ . Pro každou koncentraci 14-3-3 ζ byla z naměřených intenzit určena hodnota ustálené anizotropie fluorescence.

3.4. Analytická gelová permeační chromatografie

Metoda se používá k hodnocení proteinů migrujících v roztoku za nativních podmínek při zachování jejich přirozené struktury a biologické aktivity. Experiment byl proveden k ověření tvorby komplexu mezi fosforylovanou molekulou prokaspasy-2 a proteinem 14-3-3 ζ .

3.5. Nativní elektroforesa

Při nativní elektroforese putují vzorky polyakrylamidovým gelem bez přídavku denaturačních činidel v TBE pufru, pH 8.3 (TBE-PAGE). Metoda měla za cíl prokázat tvorbu komplexů proteinu 14-3-3 s prokaspasou-2 fosforylovanou pouze na jednom ze dvou fosforylačních míst nebo na obou místech najednou. Podobně byla testována tvorba komplexů 14-3-3 s CaMKK2 s kombinací jednoho či obou fosforylovaných míst.

3.6. Limitovaná proteolýsa

Metoda limitované proteolýsy byla použita pro porovnání odhalených úseků v molekule prokaspasy-2 přístupných k proteolytickému štěpení trypsinem a chymotrypsinem v molekule prokaspasy-2 samotné a v komplexu se 14-3-3.

3.7. Vodík/deuteriová výměna (H/D výměna) spojená s hmotnostní spektrometrií

H/D výměna je založena na kinetice vodíků amidových skupin peptidové vazby v čase. Metoda dává informace o přístupnosti povrchu molekuly proteinu pro rozpouštědlo, a tím tedy informace o terciární struktuře bílkovin.

Pro analýzu interakcí mezi prokaspasou-2 a proteinem 14-3-3 byla provedena H/D výměna jednak u jednotlivých proteinů a jednak u jejich komplexu. Oblasti molekul podléhající deuteraci byly poté porovnány.

3.8. Krystalografie

Krystalografie proteinů je biofyzikální metoda, která se používá k určení prostorové struktury bílkovin. Krystalizace proteinů probíhá ve vodném prostředí a je závislá na celé řadě faktorů, jako jsou pH, teplota, iontová síla roztoku, koncentrace jednotlivých komponent v roztoku, přítomnost aditiv, detergentů a iontů kovů, a také hlavně na čistotě a koncentraci proteinového vzorku. Hledají se takové parametry roztoku, které mají vliv na rozpustnost proteinu a jsou důležité při hledání hranice mezi vznikem amorfního precipitátu a tvorbou krystalu.

Byla krystalována forma proteinu 14-3-3 γ (zkrácená o C-terminální flexibilní úsek) s dvojitě fosforylovaným peptidem prokaspasy-2 obsahujícím oba vazebné motivy Ser¹³⁹ a Ser¹⁶⁴. Krystalizace probíhala metodou difúze par ve formě visících kapek.

4. Výsledky

4.1. Charakterizace vazby prokaspasy-2 (dp) s proteinem 14-3-3 ζ a 14-3-3 γ

Kaspasa-2 byla exprimována v rozsahu aminokyselin 123-452. Mutací v aktivním místě kaspasy-2 C320S byla zamezena její maturace bakteriálními enzymy nebo autokatalytickým štěpením v průběhu její exprese v bakteriích *E. coli*. Tento konstrukt poskytl stabilní expresi rozpustného proteinu (prokaspasa-2).

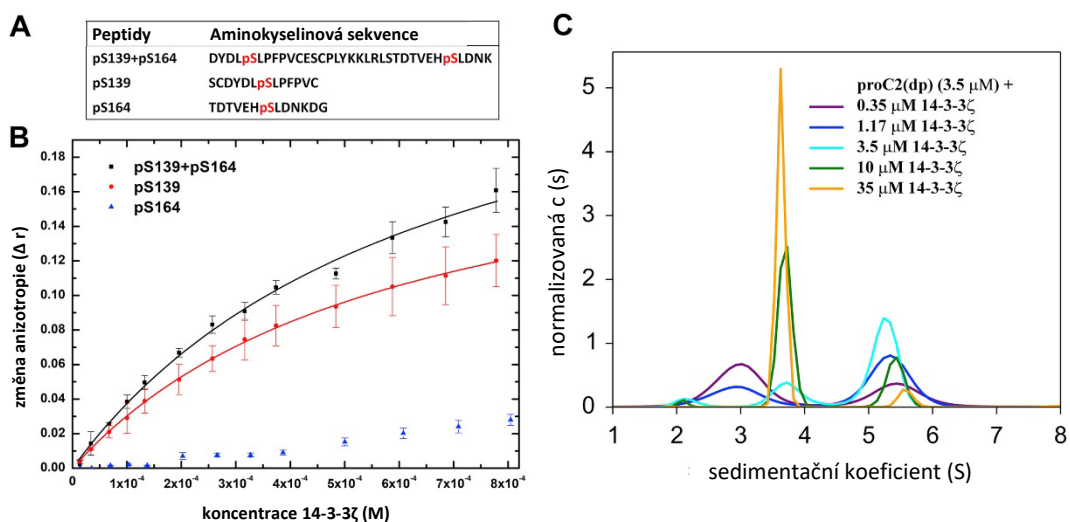
4.1.1. Vazebná místa Ser¹³⁹ a Ser¹⁶⁴ pro vazbu prokaspasy-2 (dp) a 14-3-3 ζ mají různou vazebnou afinitu

Pro charakterizaci jednotlivých vazebných míst Ser¹³⁹ a Ser¹⁶⁴ prokaspasy-2 byly objednány fosfopeptidy vždy s jedním fosforylovaným vazebným motivem (pS¹³⁹ nebo pS¹⁶⁴) a dvojnásobně fosforylovaný peptid obsahující oba vazebné motivy (pS¹³⁹+pS¹⁶⁴) (obr. 1A), N-terminálně značené fluorescenční značkou FITC. Jejich vazba na protein 14-3-3 ζ byla měřena fluorescenčně polarizační esejí. Vazba peptidu pS¹⁶⁴ byla velmi slabá. Vazba peptidu pS¹³⁹ byla výrazně vyšší a její hodnota dosahovala téměř vazby dvojitě fosforylovaného peptidu pS¹³⁹+pS¹⁶⁴, jehož vazebná afinita se pohybovala v mikromolárním rozpětí (obr. 1B).

4.1.2. Dvojitě fosforylovaná kaspasa-2 spolu s dimerem proteinu 14-3-3 ζ tvoří stabilní komplex

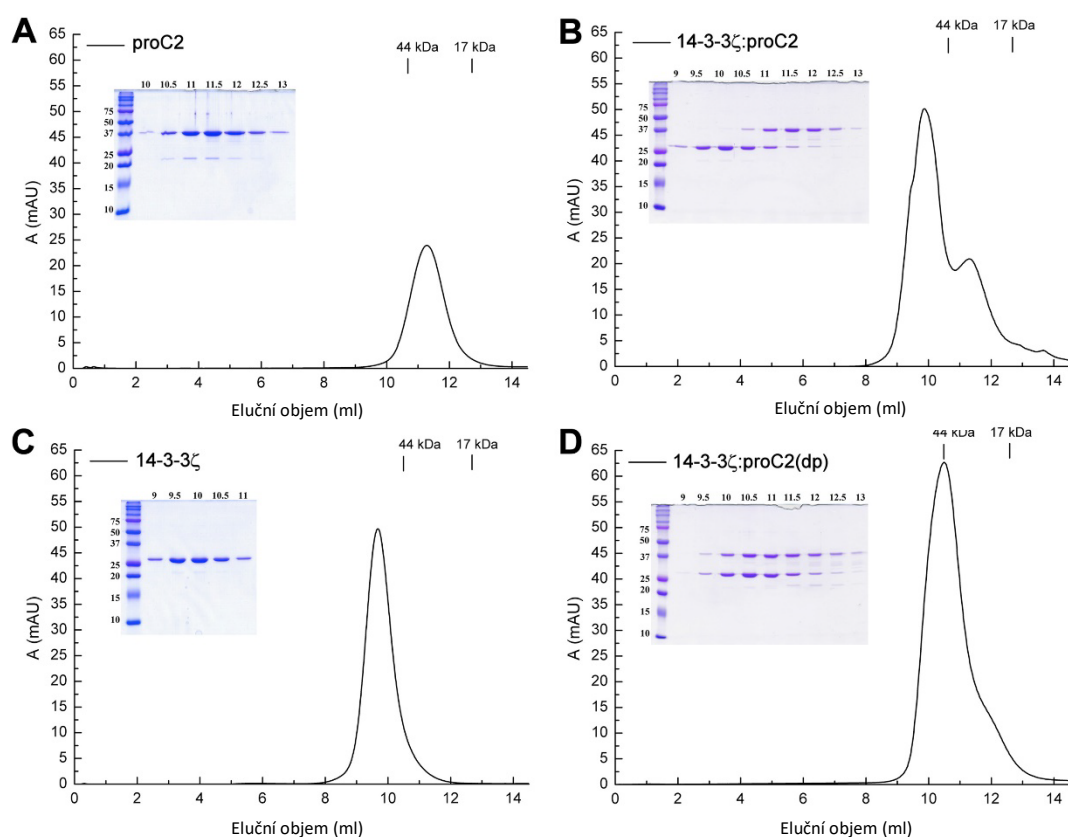
Pro ověření vazby proteinu 14-3-3 ζ a prokaspasy-2 bylo nutné připravit prokaspasu-2 fosforylovanou v místech Ser¹³⁹ a Ser¹⁶⁴. Pro úspěšnou fosforylací byla vazebná místa upravena mutagenezí pro možnost fosforylace pomocí PKA. Komplex proteinů 14-3-3 ζ a prokaspasy-2 fosforylované na obou vazebných místech (prokaspasa-2 (dp)) byl studován metodou SV AUC. Byla sledována distribuce částic ve směsi prokaspasy-2 (dp) o koncentraci 3.5 μ M v kombinaci se zvyšujícími se koncentracemi proteinu 14-3-3 ζ v hodnotách 0.35 – 35 μ M. Bylo potvrzeno, že proteiny spolu tvoří stabilní komplex, z jehož molekulové hmotnosti

~110 kDa odpovídající sedimentačnímu koeficientu 5.8 S byl určen stechiometrický poměr molekul v komplexu 1:2, kdy jedna molekula prokaspasy-2 (dp) se váže k dimeru 14-3-3 ζ . Byla také určena hodnota zdánlivé disociační konstanty proteinového komplexu K_D 230 ± 30 nM. Měření a analýzu výsledků provedla Olivia Petrvalská (obr. 1C).



Obr. 1: (A) Aminokyselinové sekvence syntetických fosfopeptidů určených pro fluorescenčně polarizační esej. (B) Vazba fluorescenčně značených fosfopeptidů kaspasy-2 obsahujících vazebné motivy k proteinu 14-3-3 ζ . (C) Série normalizovaných distribucí $c(s)$ pro směsi prokaspasy-2 (dp) a 14-3-3 ζ v různých molárních poměrech.

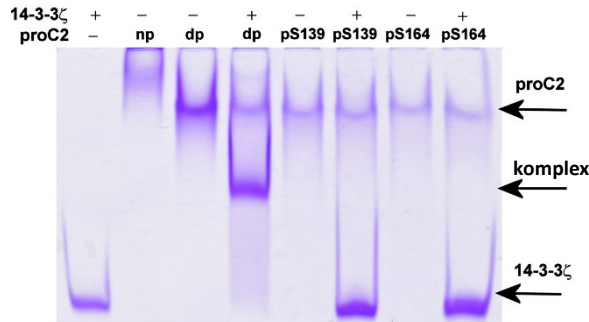
Tvorba komplexu proteinů prokaspasy-2 (dp) se 14-3-3 ζ byla též sledována gelovou permeační chromatografií za nativních podmínek. Eluce směsi nefosforylované prokaspasy-2 s proteinem 14-3-3 ζ ve stechiometrickém poměru 1:2 ukázala dva překrývající se, avšak zřetelně odlišené individuální vrcholy. Oproti tomu molekuly ve směsi prokaspasy-2 (dp) se 14-3-3 ζ migrovaly jako částice stejné velikosti a na chromatogramu ukázaly jeden vrchol (obr.2).



Obr. 2: Gelová permeační chromatografie. (A) prokaspasa-2 (B) Směs prokaspasy-2 a 14-3-3 ζ v molárním poměru 1:2 (C) 14-3-3 ζ (D) směs prokaspasy-2 (dp) a 14-3-3 ζ . Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE.

4.1.3. Pro vytvoření stabilního komplexu mezi proteiny prokaspasy-2 (dp) a dimerem proteinu 14-3-3 ζ je nutná přítomnost obou fosforylovaných vazebných motivů

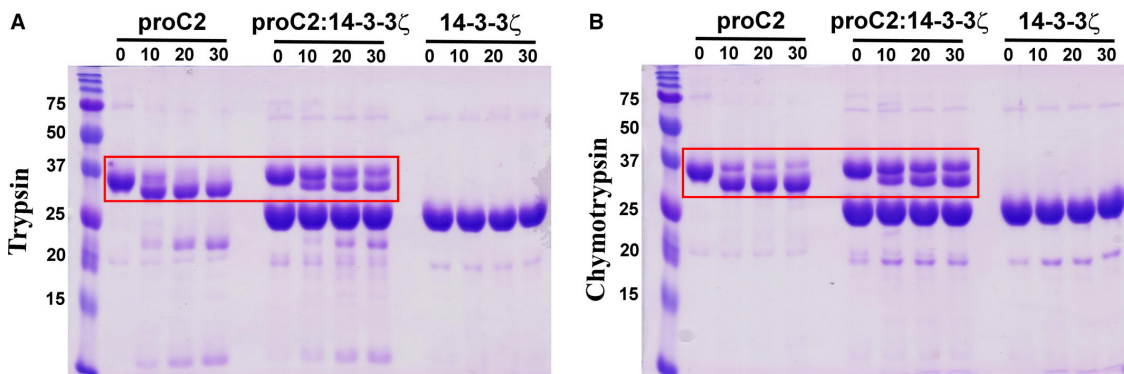
Formování komplexu s proteinem 14-3-3 ζ bylo ověřeno nativní TBE-PAGE. Komplex se vytvořil pouze u varianty, kde byly oba seriny Ser¹³⁹ a Ser¹⁶⁴ fosforylované. Přítomnost pouze jednoho fosforylačního místa byla pro vytvoření stabilního komplexu nedostatečná (obr. 3).



Obr. 3: Nativní TBE-PAGE. Interakce 14-3-3 ζ s prokaspasou-2 fosforylovanou na Ser¹³⁹, na Ser¹⁶⁴ anebo na obou serinech Ser¹³⁹ a Ser¹⁶⁴.

4.1.4. Vazba dimeru 14-3-3 ζ chrání prokaspasu-2 před proteolytickou degradací *in vitro*

Experiment využívající metodu limitované proteolýzy byl zvolen pro potvrzení hypotézy, že dimer 14-3-3 obklopující N-terminální část molekuly prokaspasy-2 chrání tento úsek před proteolýzou.



Obr. 4: Limitovaná proteolýza prokaspasy-2 samotné a v komplexu s proteinem 14-3-3 ζ enzymy trypsinem (A) a chymotrypsinem (B) v časových intervalech 0, 10, 20 a 30 minut.

Byla provedena limitovaná proteolýza jak samotných proteinů, tak jejich komplexu, enzymy trypsinem a chymotrypsinem v postupných časových intervalech. Samotná prokaspasa-2 byla velmi sensitivní k proteolytické degradaci

trypsinem i chymotrypsinem, vazba 14-3-3 ζ však její proteolýzu značně potlačila (obr. 4). Štěpené fragmenty byly analyzovány metodou hmotnostní spektrometrie.

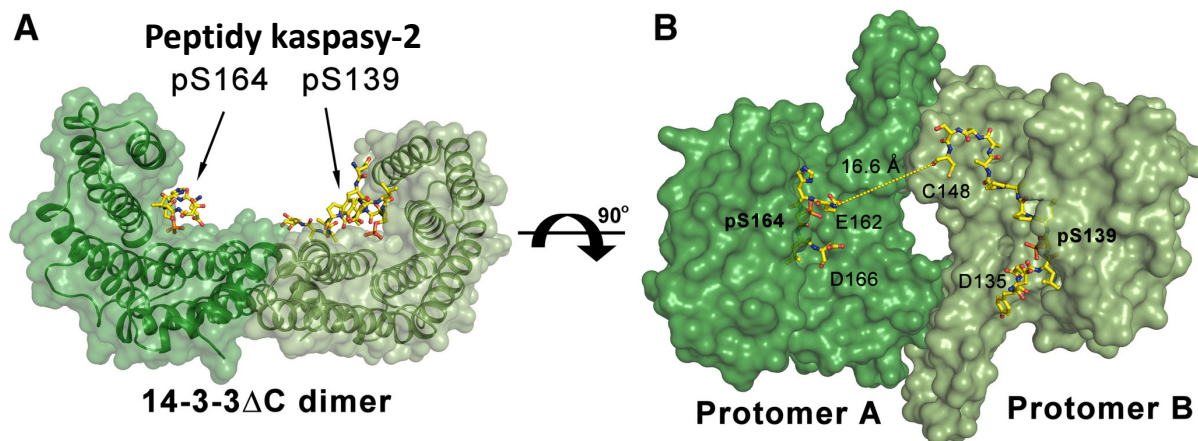
4.1.5. 14-3-3 γ interaguje v komplexu s prokaspasou-2 (dp) s C-terminální částí její domény p12, která je zapojena do dimerizace kaspasové molekuly

Pro sledování úseků molekul prokaspasy-2 (dp) a proteinu 14-3-3 γ , které jsou zapojeny do vzájemné interakce, byla zvolena metoda H/D výměny spojené s hmotnostní spektrometrií. Měření deuterizace prokaspasy-2 (dp) v komplexu se 14-3-3 γ zaznamenalo pokles izotopové výměny oproti samotné prokaspase-2 (dp), a to jak v úseku Ser¹³⁹ (rozsah aminokyselin 135-146), tak také v doméně p12 (408-413), což svědčí o protekci těchto úseků prokaspasy-2 (dp) vazbou se 14-3-3 γ . Měření HDX-MS a její analýzu provedli František Filandr a Petr Man z Mikrobiologického ústavu AV ČR, Biocev

4.1.6. Krystalová struktura komplexu 14-3-3 $\gamma\Delta$ C s dvojitě fosforylovaným peptidem prokaspasy-2 pS¹³⁹+pS¹⁶⁴

Pro detailní představu o vazebném místě prokaspasy-2 s proteinem 14-3-3 byla vyřešena krystalová struktura komplexu dvojitě fosforylovaného peptidu prokaspasy-2 s proteinem 14-3-3 $\gamma\Delta$ C. 14-3-3 $\gamma\Delta$ C (rezidua 1-234) je zkrácená forma proteinu 14-3-3 γ o C-terminální flexibilní úsek, který je neuspořádaný a v krystalových strukturách neviditelný. Fosfopeptid prokaspasy-2 byl dlouhý 34 aminokyselin v rozsahu Asp¹³⁵ – Lys¹⁶⁸, obsahoval fosforylační místa Ser¹³⁹ a Ser¹⁶⁴ a jadernou lokalizační sekvenci. Krystalová struktura s rozlišením 2.7 Å ukázala fosfopeptid vázaný uvnitř centrálního kanálu 14-3-3 dimeru, se Ser¹³⁹ vázaným ve vazebném žlábků jednoho protomeru a se Ser¹⁶⁴ vázaným ve vazebném žlábků protomeru druhého (obr. 5). Okolí fosforylačního motivu Ser¹³⁹ je pevně vázáno polárními vazbami, zatímco v okolí Ser¹⁶⁴ byla s dostatečnou elektronovou densitou identifikována pouze 4 aminokyselinová rezidua Glu¹⁶²-Asp¹⁶⁶. Tato pozorování podporují již zjištěný fakt, že Ser¹³⁹ je primární vazebné místo s vysokou

afinitou a Ser¹⁶⁴ je místem sekundárním, avšak nutným pro úplnou biologickou aktivitu. Krystalizace proběhla pod dohledem prof. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D. na Přírodovědecké fakultě UK v Praze, počítačovou analýzu krystalové struktury provedla vedoucí projektu RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.



Obr. 5: Krystalová struktura fosfopeptidu prokaspasy-2 pS¹³⁹+pS¹⁶⁴ vázaného k dimeru 14-3-3 γ Δ C (PDB ID: 6SAD). Přerušovaná žlutá linka na obrázku B značí sekvenci linkeru mezi Ser¹³⁹ a Ser¹⁶⁴, která nebyla v krystalové struktuře viditelná.

4.2. Charakterizace vazby CaMKK2 s proteinem 14-3-3 γ

CaMKK2 byla exprimována v rozsahu aminokyselin 93-517. Mutací v aktivním místě D330A bylo zamezeno její autofosforylaci. Cílenou mutagenézí byly připraveny varianty CaMKK2, které obsahovaly buď jedno fosforylační vazebné místo Ser¹⁰⁰ nebo Ser⁵¹¹, anebo obě tato fosforylační místa najednou. Formování komplexu s proteinem 14-3-3 γ bylo ověřeno nativní TBE-PAGE. Z experimentu vyplynulo, že CaMKK2 tvoří stabilní komplex s proteinem 14-3-3 γ , a to i v přítomnosti pouze jednoho fosforylačního místa.

5. Diskuse

Kaspasa-2 se účastní reakcí, které rozhodují o přežití buňky či o jejím zániku. Reaguje na extra i intracelulární apoptotické stimuly a spouští kaskádu dějů vedoucích k apoptose. Regulace aktivace kaspasy-2 je pro tyto pochody klíčovým bodem. Kaspasa-2 se vyskytuje v buňkách ve formě neaktivního zymogenu (prokaspasa-2) a regulace její aktivace probíhá posttranslačně, stejně jako u ostatních kaspas.

Fosforylace pomocí kinasy CaMKII popsaná u *X. laevis* na Ser¹³⁵ (Ser¹⁶⁴ u lidské kaspasy-2) vede k vazbě proteinu 14-3-3, který udržuje prokaspasu-2 v inhibovaném nematurovaném stavu. Defosforylací fosfatasou PP1 se prokaspasa-2 uvolní z vazby s proteinem 14-3-3, dojde k vazbě s adaptorovými proteiny a k okamžité aktivaci (Nutt et al., 2009, 2005). U lidské prokaspasy-2 existují další tři fosforylační místa zapojená do regulace její aktivity. Je to Ser¹⁵⁷, cíl proteinkinasy CK2, jehož fosforylace oslabuje aktivaci prokaspasy-2 (Shin et al., 2005); Ser³⁴⁰, cíl CDK1 (z angl. cyclin-dependent kinase 1), jehož fosforylace inhibuje autolytické štěpení prokaspasy-2 během maturace a chrání tím buňky před apoptosou během mitotické části buněčného cyklu (Andersen et al., 2009), a Ser¹³⁹, cíl dosud neidentifikované kinasy, jehož fosforylace může být zapojena do tumorsupresivních funkcí kaspasy-2 (Ren et al., 2012). Bioinformatické analýzy naznačily, že Ser¹³⁹ by mohl být u člověka spolu se Ser¹⁶⁴ vazebným místem pro regulační protein 14-3-3, což je také v souladu s výskytem dvou fosforylačních míst vzdálených od sebe přibližně 20 aminokyselin i u mnoha dalších vazebných partnerů proteinů 14-3-3 (Alblova et al., 2017; Molzan and Ottmann, 2012; Rittinger et al., 1999; Rose et al., 2012; Sluchanko et al., 2017).

Z naší studie vyplynulo, že obě fosforylační místa Ser¹³⁹ i Ser¹⁶⁴ se podílejí na vazbě prokaspasy-2 s proteinem 14-3-3 ζ . Navíc bylo zjištěno, že pro vytvoření komplexu mezi těmito dvěma proteiny je potřeba obou fosforylovaných serinů Ser¹³⁹ i Ser¹⁶⁴ (obr. 3). Rozdíl ve vazebné afinitě peptidů prokaspasy-2, které obsahovaly

po jednom fosforylovaném motivu (pS¹³⁹ nebo pS¹⁶⁴) nebo oba motivy najednou (pS¹³⁹+pS¹⁶⁴) (obr. 1A), ukázal, že dominantní funkci ve vazbě prokaspasy-2 k proteinu 14-3-3ζ má vazebné místo obsahující pSer¹³⁹; vazebné místo obsahující pSer¹⁶⁴ je sekundární. Je však nepostradatelné pro plnou biologickou aktivitu enzymu (obr. 1B) (Yaffe, 2002).

Ze srovnání vazebné afinity prokaspasy-2 (123-452) o hodnotě K_D 230 ± 30 nM, s vazebnou afinitou fosfopeptidu prokaspasy-2 pS¹³⁹+pS¹⁶⁴, která byla v mikromolárním rozpětí, vyplynulo, že na vazbě prokaspasy-2 k proteinu 14-3-3ζ se podílí i ostatní části molekuly prokaspasy-2. Tato skutečnost byla popsána již dříve u komplexů 14-3-3 se serotonin N-acetyltransferasou (AANAT) (Obsil et al., 2001), neutrální trehalasou (Nth1) (Alblova et al., 2017) a heat shock proteinem HSPB6 (Sluchanko et al., 2017).

Hypotézu, že do vazby molekuly prokaspasy-2 k proteinu 14-3-3ζ jsou kromě vazebných fosforylovaných motivů zapojeny také ostatní části molekuly prokaspasy-2, podpořilo vytvoření strukturního modelu založeném na datech z měření SAXS a vzdálenostních omezeních 14-3-3γ a domény p12 získanými pomocí chemického zesíťení kombinovaného s hmotnostní spektrometrií. N-terminální část prokaspasy-2 obsahující linker s vazebnými místy Ser¹³⁹ a Ser¹⁶⁴ je zanořena u dna centrálního žlábků dimeru 14-3-3ζ. Konstrukt použitý pro tuto studii postrádal N-terminální prodoménu CARD nezbytnou pro vazbu adaptorových proteinů, je-li však linker mezi CARD a p19 doménou skrytý uvnitř dimeru 14-3-3, můžeme usuzovat, že i prodoména CARD je s dimerem 14-3-3 v těsném kontaktu. Z našich měření dále vyplývá, že také většina malé katalytické podjednotky p12 prokaspasy-2 je uvnitř centrálního žlábků 14-3-3ζ a její helix α7 interaguje s klíčkou mezi helixy H3 a H4 proteinu 14-3-3ζ. Pozice domén p12 a p19 prokaspasy-2 jsou stabilizovány interakcí s helixy H9 obou protomerů 14-3-3ζ. Tyto výsledky byly potvrzeny i měření H/D výměny spojené s hmotnostní spektrometrií, kdy po vytvoření komplexu prokaspasy-2 (dp) se 14-3-3γ klesla míra izotopové výměny jak v oblasti vazebného místa Ser¹³⁹ (úsek aminokyselin 135-146), tak také v místě C-

terminálního helixu $\alpha 7$ v doméně p12 (408-413), což svědčí o protekci těchto úseků prokaspasy-2 (dp) proteinem 14-3-3 γ .

Proenzym kaspasy-2 je aktivován vazbou na vysokomolekulární komplex složený z adaptorových proteinů, ve kterém získají molekuly prokaspasy-2 vhodnou prostorovou orientaci pro následnou autoproteolýzu (Park et al., 2007). Je odštěpena prodoména CARD a linkery mezi doménami a vzniká maturovaná aktivní kaspasa-2 jako heterodimer složený ze dvou p19 a dvou p12 katalytických podjednotek. Bylo prokázáno, že dimerizace prokaspasy-2 vyžaduje jak doménu CARD, tak aminokyselinová rezidua z C-koncové domény p12 (Butt et al., 1998; Schweizer et al., 2003; Tang et al., 2011). Naše data ukázala, že oba regiony potřebné pro dimerizaci prokaspasy-2 jsou v těsném kontaktu s molekulou dimeru 14-3-3, a proto způsob, kterým 14-3-3 inhibuje aktivaci prokaspasy-2, může být cestou zabránění oligomerizace prokaspasy-2 a/nebo její vazby na adaptorové proteiny.

Kaspasa-2 se jako jediná s kaspas vyskytuje nejenom v cytoplasmě buňky, ale také jádře. V závislosti na druhu podnětu má dva oddělené aktivační profily. Zásahy do buňky poškozující DNA vyvolávají aktivaci prokaspasy-2 v jádře, zatímco aktivace v cytoplasmě je odezvou na jiné stresové podněty (Ando et al., 2017). Lokalizace prokaspasy-2 je řízena jadernou lokalizační sekvencí, která je umístěna přesně mezi oběma 14-3-3 vazebnými motivy Ser¹³⁹ a Ser¹⁶⁴ v linkeru mezi prodoménou CARD a velkou podjednotkou p19 katalytické domény prokaspasy-2 (Baliga et al., 2003; Mancini et al., 2000; O'Reilly et al., 2002). Krystalická struktura dvojitě fosforylovaného peptidu prokaspasy-2 pS¹³⁹+pS¹⁶⁴ v rozsahu aminokyselin 135-168 potvrdila, že k interakci mezi proteinem 14-3-3 $\gamma\Delta C$ a prokaspasou-2 jsou nutné oba fosforylované vazebné motivy Ser¹³⁹ a Ser¹⁶⁴, a také našla další interakce mezi linkerem spojujícím tyto dva motivy a 14-3-3 $\gamma\Delta C$. Jelikož je tato oblast prokaspasy-2 zanořena do centrálního žlábků dimeru 14-3-3, můžeme usuzovat, že protein 14-3-3 při vazbě na prokaspasu-2 kryje její NLS a může tak inhibovat aktivaci kaspasy-2 prostřednictvím její lokalizace v buňce.

Strukturní analýza dále potvrdila, že Ser¹³⁹ je dominantním vazebným místem, které je se svým okolím pevně vázáno polárními vazbami ve vazebném žlábků jednoho protomeru 14-3-3, kdežto Ser¹⁶⁴ leží v neuspořádané C-terminální části linkeru prokaspasy-2 s nižší afinitou k povrchu protomeru druhého. Pro formování komplexu jsou však nutná obě tato fosforylovaná místa. Fosforylace Ser¹³⁹ vyvolá interakci s regulačním proteinem 14-3-3, která je doplněna a stabilizována interakcí s druhým sekundárním fosforylovaným motivem Ser¹⁶⁴ s nižší afinitou (Yaffe, 2002).

Dalším vazebným partnerem proteinů 14-3-3, u kterého byla provedena charakterizace interakce, je kinasa CaMKK2. Mezi čtyřmi kandidátními fosforylačními vazebnými místy byla potvrzena dvě místa, a to Ser¹⁰⁰ a Ser⁵¹¹, která se účastní vazby s proteinem 14-3-3 γ . Podobně jako u prokaspasy-2, i zde byl poměr molekul v komplexu 1:2, tedy jedna molekula CaMKK2 se váže k dimeru 14-3-3 γ . Metodou nativní elektroforesy v TBE pufru bylo zjištěno, že k vytvoření komplexu stačí pouze jedno fosforylované vazebné místo. Strukturní analýza komplexu však ukázala, že zatímco komplex 14-3-3 γ s CaMKK2-S¹⁰⁰ je velmi flexibilní a má asymetrický protáhlý tvar, přítomnost druhého fosforylovaného vazebného místa Ser⁵¹¹ zvýšila celkovou stabilitu komplexu a snížila konformační flexibilitu. Další měření přinesla zjištění, že protein 14-3-3 neinhibuje aktivitu kinasy CaMKK2, podobně jako je tomu u strukturně podobné CaMKK1 (Davare et al., 2004; Ichimura et al., 2008), ale spíše zpomaluje její defosforylaci. To naznačuje, že isoformy CaMKK se liší v regulaci zprostředkované 14-3-3, patrně kvůli rozdílům v jejich biochemických vlastnostech (Anderson et al., 1998; Tokumitsu et al., 2000).

6. Závěr

Cílem disertační práce bylo popsat mechanismus inhibice lidské kaspasy-2 prostřednictvím regulačních proteinů 14-3-3. Proteiny 14-3-3 interagují se svými ligandy prostřednictvím fosforylovaných vazebných motivů. Mechanismus regulace aktivity různých ligandů se liší. Svou vazbou mohou například přímo změnit konformaci vazebného partnera, mohou maskovat jeho vazebný povrch anebo vazbou dvou ligandů mohou zprostředkovat nové interakce. Jedním z vazebných partnerů je kaspasa-2, enzym působící v kaskádě dějů vedoucích k apoptose. Inhibice aktivace kaspasy-2 proteinem 14-3-3 byla popsána v souvislosti s energetickou bilancí buňky u oocytů *X. laevis* a později také u myši (Nutt et al., 2009, 2005), nebyla však popsána molekulární podstata této regulace.

Základním předpokladem bylo vypracování protokolu na expresi a purifikaci stabilní a solubilní formy enzymu kaspasy-2 v dostatečném množství a čistotě.

Z dosavadních poznatků a bioinformační analýzou byla predikována dvě možná vazebná místa v molekule prokaspasy-2, a to Ser¹³⁹ a Ser¹⁶⁴. Byla vytvořena neaktivní varianta prokaspasy-2, která nepodléhala proteolytickému štěpení a obsahovala linker s vazebnými místy pro protein 14-3-3, který se jinak při maturaci enzymu odštěpuje. Byla vytvořena varianta neaktivní prokaspasy-2, kde byla predikovaná místa Ser¹³⁹ a Ser¹⁶⁴ upravena tak, aby mohla být fosforylována PKA.

Metodami AUC a nativní elektroforézy v TBE pufru bylo potvrzeno, že prokaspasa-2 fosforylovaná na obou serinech Ser¹³⁹ a Ser¹⁶⁴ tvoří stabilní komplex s proteinem 14-3-3 ζ . Navíc bylo zjištěno, že tento komplex se tvoří pouze tehdy, jsou-li obě tato místa fosforylována.

Fluorescenčně polarizační esej, která sledovala vazbu prokaspasových fosfopeptidů k 14-3-3 ζ , odhalila, že vazebná afinita fosfopeptidů obsahujících buď Ser¹³⁹ nebo Ser¹⁶⁴ není stejná. Ser¹³⁹ s vysokou vazebnou afinitou se jeví jako primární místo vazby, kterou doplňuje sekundární vazba Ser¹⁶⁴, která je nízkoafinitní, avšak nutná pro úplnou biologickou aktivitu.

Metodou AUC byl určen stechiometrický poměr v komplexu prokaspasy-2 (dp) se 14-3-3 ζ , a to 1:2, kdy jedna molekula prokaspasy-2 (dp) se váže k dimeru 14-3-3 ζ . Byla stanovena hodnota zdánlivé disociační konstanty proteinového komplexu K_D 230 ± 30 nM.

Strukturním modelováním založeném na výsledcích ze SAXS a chemického zesílení byl vytvořen model komplexu, který ukázal jeho kompaktní tvar, ve kterém je molekula prokaspasy-2 (dp) svým linkerem s vazebnými místy Ser¹³⁹ a Ser¹⁶⁴ a také C-terminální částí podjednotky p12 zanořena do centrálního žlábků dimeru 14-3-3 ζ a celá molekula prokaspasy-2 (dp) je stabilizována interakcí s helixy H9 obou protomerů proteinu 14-3-3 ζ . Z modelu vyplynulo, že na interakci mezi proteiny se podílí kromě vazebných míst Ser¹³⁹ a Ser¹⁶⁴ i ostatní části obou molekul. S tímto zjištěním jsou v souladu i výsledky měření HDX-MS, které odhalily místa kontaktu molekuly prokaspasy-2 (dp) se 14-3-3 γ . Také rozdíl ve vazebné afinitě fosfopeptidů prokaspasy-2 s disociační konstantou v mikromolárním rozpětí a afinitě molekuly prokaspasy-2 (dp) (123-452) s disociační konstantou v rozpětí nanomolárním potvrzuje podíl dalších částí molekul na vzájemné vazbě.

Neboť protein 14-3-3 svou vazbou prostorově obklopuje malou katalytickou podjednotku p12 prokaspasy-2, která se účastní její oligomerizace, usuzujeme, že mechanismus inhibice aktivace prokaspasy-2 proteinem 14-3-3 může být v blokování její oligomerizace během maturace a/nebo blokování její vazby na adaptorové proteiny.

Krystalizace fosfopeptidu prokaspasy-2 obsahujícím obě vazebná místa Ser¹³⁹ a Ser¹⁶⁴ v rozpětí aminokyselin 135-168 s proteinem 14-3-3 $\gamma\Delta C$ dala představu o detailním postavení aminokyselin ve vazebném místě. Krystalová struktura komplexu ukázala, že protein 14-3-3 svou vazbou též obklopuje jadernou lokalizační sekvenci, která se nachází v molekule prokaspasy-2 na spojnici mezi vazebnými motivy Ser¹³⁹ a Ser¹⁶⁴. Proto dalším možným mechanismem vlivu proteinu 14-3-3 na její aktivaci může být blokování její translokace z cytoplasmy do jádra a následné

aktivace v jádru buňky, ke které dochází v případech poškození dvoušroubovicové DNA.

V projektu charakterizace vazby proteinu 14-3-3 ke kinase CaMKK2 bylo očekáváno pozorování inhibice aktivity kinasy, podobně jako je tomu u jejího isomeru CaMKK1. Tento jev nebyl potvrzen, pozorováno bylo spíše zpomalení defosforylace CaMKK2 po vazbě na protein 14-3-3. Byla identifikována dvě vazebná místa v molekule CaMKK2, a to Ser¹⁰⁰ a Ser⁵¹¹. Metoda TBE-PAGE odhalila, že k vytvoření komplexu mezi molekulami stačí pouze jedno fosforylované místo, nicméně strukturní analýzy komplexů 14-3-3 γ s molekulami CaMKK2-S¹⁰⁰ a CaMKK2-S^{100,511} ukázaly, že vazba obou fosforylovaných míst najednou přispěje k celkové stabilitě komplexu a snížení jeho konformační flexibility.

7. Souhrn

Kaspasa-2 je jedním z enzymů v kaskádě dějů vedoucích k apoptose. Má významnou úlohu v rozhodování o osudu buňky, a proto je regulace jejího zapojení do apoptotických dějů velmi významná. Náplní této disertační práce bylo objasnění jednoho ze způsobů inhibice aktivity lidské kaspasy-2, a to prostřednictvím její posttranslační modifikace fosforylace a následné vazby regulačního proteinu 14-3-3. Ve studii bylo potvrzeno, že protein 14-3-3 se váže na dvě fosforylační místa v molekule prokaspasy-2 umístěná v linkeru mezi N-terminální prodoménou CARD a velkou katalytickou podjednotkou p19. Komplex tvoří jedna molekula prokaspasy-2 vázaná na dimer 14-3-3, se silnou vazebnou afinitou. Komplex má kompaktní tvar, ve kterém je molekula prokaspasy-2 částečně zanořena do centrálního žlábků dimeru a stabilizována C-terminálními helixy obou protomerů proteinu 14-3-3. Na dně centrálního kanálu dimeru je vázaná část molekuly prokaspasy-2 obsahující fosforylovaná vazebná místa Ser¹³⁹ a Ser¹⁶⁴, jadernou lokalizační sekvenci a také malou katalytickou podjednotku p12. Vzhledem k těmto místům interakce lze usuzovat, že jedním ze způsobů regulace prokaspasy-2 proteinem 14-3-3 je inhibice její oligomerizace a/nebo vazby na adaptorové proteiny. Druhým možným způsobem je regulace aktivace prostřednictvím lokalizace v buňce.

CaMKK2 je člen rodiny kalcium/kalmodulin dependentních kinas podílejících se na celé řadě pochodů v organismu. Samotný gen CaMKK2 má nejsilnější expresi v mozku a ovlivňuje signální kaskády související s učením a pamětí, diferenciací a migrací neuronů, růstem neuritů a tvorbou synapsí (Hatsuda et al., 2023; Lee et al., 2022; Najar et al., 2021). Porozuměním mechanismu regulace aktivity této kinasy prostřednictvím proteinu 14-3-3 se výzkum může přiblížit k vysvětlení příčin poruch s kinasou spojených.

8. Summary

Caspase-2 acts as one of the enzymes in the cascade of reactions leading to apoptosis. It plays an important role in cell fate decision and therefore regulation of its involvement in apoptosis is very important. The aim of this thesis was to elucidate one of the ways of regulation of human caspase-2 activity, namely its post-translational modification by phosphorylation and subsequent binding of the scaffolding protein 14-3-3. In this study, it was confirmed that the 14-3-3 protein binds to two phosphorylation sites in the procaspase-2 molecule located within the linker between the N-terminal CARD prodomain and the large catalytic subunit p19. The complex consists of a single procaspase-2 molecule bound to the 14-3-3 dimer, with a strong binding affinity. The complex has a compact shape in which the procaspase-2 molecule is partially embedded in the central groove of the dimer and stabilized by interactions with the C-terminal helices of both 14-3-3 protomers. Sterically occluded within the central groove of the dimer is a sequence of the procaspase-2 molecule containing phosphorylated Ser¹³⁹ and Ser¹⁶⁴ binding sites, a nuclear localization sequence, as well as a small catalytic subunit, p12. Given these interaction sites, it can be inferred that a possible way of inhibition of procaspase-2 by 14-3-3 protein is through preventing its oligomerization and/or binding to adaptor proteins. The second possible mode of inhibition is through cellular localization.

CaMKK2 is a member of a family of calcium/calmodulin-dependent kinases involved in a variety of processes in the body. The CaMKK2 gene itself has the strongest expression in the brain and influences signalling cascades related to learning and memory, neuronal differentiation and migration, neurite outgrowth, and synapse formation (Hatsuda et al., 2023; Lee et al., 2022; Najjar et al., 2021). By understanding the mechanism of regulation of this kinase activity by the 14-3-3 protein, research may move closer to explaining the causes of kinase-related disorders.

9. Literatura

- 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714491114>
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J., 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81334-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81334-3)
- Andersen, J.L., Johnson, C.E., Freel, C.D., Parrish, A.B., Day, J.L., Buchakjian, M.R., Nutt, L.K., Thompson, J.W., Moseley, M.A., Kornbluth, S., 2009. Restraint of apoptosis during mitosis through interdomain phosphorylation of caspase-2. *EMBO J.* 28, 3216–3227. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.253>
- Anderson, K.A., Means, R.L., Huang, Q.H., Kemp, B.E., Goldstein, E.G., Selbert, M.A., Edelman, A.M., Fremeau, R.T., Means, A.R., 1998. Components of a calmodulin-dependent protein kinase cascade. Molecular cloning, functional characterization and cellular localization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta. *J. Biol. Chem.* 273, 31880–31889. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.48.31880>
- Ando, K., Parsons, M.J., Shah, R.B., Charendoff, C.I., Paris, S.L., Liu, P.H., Fassio, S.R., Rohrman, B.A., Thompson, R., Oberst, A., Sidi, S., Bouchier-Hayes, L., 2017. NPM1 directs PIDDosome-dependent caspase-2 activation in the nucleolus. *J. Cell Biol.* 216, 1795–1810. <https://doi.org/10.1083/jcb.201608095>
- 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>
- Braga, M., Sinha Hikim, A.P., Datta, S., Ferrini, M.G., Brown, D., Kovacheva, E.L., Gonzalez-Cadavid, N.F., Sinha-Hikim, I., 2008. Involvement of oxidative stress and caspase 2-mediated intrinsic pathway signaling in age-related increase in muscle cell apoptosis in mice. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 13, 822–832. <https://doi.org/10.1007/s10495-008-0216-7>
- Butt, A.J., Harvey, N.L., Parasivam, G., Kumar, S., 1998. Dimerization and autoprocessing of the Nedd2 (caspase-2) precursor requires both the prodomain and the carboxyl-terminal regions. *J. Biol. Chem.* 273, 6763–6768. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.12.6763>
- Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T.A., March, C.J., Kronheim, S.R., Druck, T., Cannizzaro, L.A., 1992. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256, 97–100. <https://doi.org/10.1126/science.1373520>

- Connolly, P., Garcia-Carpio, I., Villunger, A., 2020. Cell-Cycle Cross Talk with Caspases and Their Substrates. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 12, a036475. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036475>
- Dorstyn, L., Puccini, J., Wilson, C.H., Shalini, S., Nicola, M., Moore, S., Kumar, S., 2012. Caspase-2 deficiency promotes aberrant DNA-damage response and genetic instability. *Cell Death Differ.* 19, 1288–1298. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.36>
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H., 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 383–424. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.383>
- Gu, H., Chen, X., Gao, G., Dong, H., 2008. Caspase-2 functions upstream of mitochondria in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by bortezomib in human myeloma cells. *Mol. Cancer Ther.* 7, 2298–2307. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0186>
- Hatsuda, A., Kurisu, J., Fujishima, K., Kawaguchi, A., Ohno, N., Kengaku, M., 2023. Calcium signals tune AMPK activity and mitochondrial homeostasis in dendrites of developing neurons. *Dev. Camb. Engl.* dev.201930. <https://doi.org/10.1242/dev.201930>
- Kumar, S., Kinoshita, M., Noda, M., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., 1994. Induction of apoptosis by the mouse *Nedd2* gene, which encodes a protein similar to the product of the *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-3* and the mammalian IL-1 beta-converting enzyme. *Genes Dev.* 8, 1613–1626. <https://doi.org/10.1101/gad.8.14.1613>
- Lassus, P., Opitz-Araya, X., Lazebnik, Y., 2002. Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* 297, 1352–1354. <https://doi.org/10.1126/science.1074721>
- Lee, A., Kondapalli, C., Virga, D.M., Lewis, T.L., Koo, S.Y., Ashok, A., Mairet-Coello, G., Herzig, S., Foretz, M., Viollet, B., Shaw, R., Sproul, A., Polleux, F., 2022. A β 42 oligomers trigger synaptic loss through CAMKK2-AMPK-dependent effectors coordinating mitochondrial fission and mitophagy. *Nat. Commun.* 13, 4444. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32130-5>
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X., 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147–157. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80085-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80085-9)
- Madden, S.D., Cotter, T.G., 2008. Cell death in brain development and degeneration: control of caspase expression may be key! *Mol. Neurobiol.* 37, 1–6. <https://doi.org/10.1007/s12035-008-8021-4>
- Mancini, M., Machamer, C.E., Roy, S., Nicholson, D.W., Thornberry, N.A., Casciola-Rosen, L.A., Rosen, A., 2000. Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *J. Cell Biol.* 149, 603–612. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.3.603>

- Molzan, M., Ottmann, C., 2012. Synergistic binding of the phosphorylated S233- and S259-binding sites of C-RAF to one 14-3-3 ζ dimer. *J. Mol. Biol.* 423, 486–495. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.08.009>
- Najar, M.A., Rex, D. a. B., Modi, P.K., Agarwal, N., Dagamajalu, S., Karthikkeyan, G., Vijayakumar, M., Chatterjee, A., Sankar, U., Prasad, T.S.K., 2021. A complete map of the Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CAMKK2) signaling pathway. *J. Cell Commun. Signal.* 15, 283–290. <https://doi.org/10.1007/s12079-020-00592-1>
- Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A., 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376, 37–43. <https://doi.org/10.1038/376037a0>
- Nutt, L.K., Buchakjian, M.R., Gan, E., Darbandi, R., Yoon, S.-Y., Wu, J.Q., Miyamoto, Y.J., Gibbons, 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 14-3-3zeta-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>
- Obsil, T., Ghirlando, R., Klein, D.C., Ganguly, S., Dyda, F., 2001. Crystal structure of the 14-3-3zeta:serotonin N-acetyltransferase complex. a role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell* 105, 257–267. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00316-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00316-6)
- O'Reilly, L.A., Ekert, P., Harvey, N., Marsden, V., Cullen, L., Vaux, D.L., Hacker, G., Magnusson, C., Pakusch, M., Cecconi, F., Kuida, K., Strasser, A., Huang, D.C.S., Kumar, S., 2002. Caspase-2 is not required for thymocyte or neuronal apoptosis even though cleavage of caspase-2 is dependent on both Apaf-1 and caspase-9. *Cell Death Differ.* 9, 832–841. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401033>
- Park, H.H., Logette, E., Raunser, S., Cuenin, S., Walz, T., Tschopp, J., Wu, H., 2007. Death domain assembly mechanism revealed by crystal structure of the oligomeric PIDDosome core complex. *Cell* 128, 533–546. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.019>
- 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>
- 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.
[https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80363-9](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80363-9)
- Rose, R., Rose, M., Ottmann, C., 2012. Identification and structural characterization of two 14-3-3 binding sites in the human peptidylarginine deiminase type VI. *J. Struct. Biol.* 180, 65–72.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2012.05.010>
- Schweizer, A., Briand, C., Grutter, 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>
- Shalini, S., Dorstyn, L., Wilson, C., Puccini, J., Ho, L., Kumar, S., 2012. Impaired antioxidant defence and accumulation of oxidative stress in caspase-2-deficient mice. *Cell Death Differ.* 19, 1370–1380.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2012.13>
- 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>
- 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. *Struct. Lond. Engl.* 1993 25, 305–316.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2016.12.005>
- Tang, Y., Wells, J.A., Arkin, M.R., 2011. Structural and enzymatic insights into caspase-2 protein substrate recognition and catalysis. *J. Biol. Chem.* 286, 34147–34154. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.247627>
- Thornberry, N.A., Lazebnik, Y., 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312–1316. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1312>
- Tinnikov, A.A., Samuels, H.H., 2013. A novel cell lysis approach reveals that caspase-2 rapidly translocates from the nucleus to the cytoplasm in response to apoptotic stimuli. *PloS One* 8, e61085.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061085>
- Tokumitsu, H., Muramatsu, M. a, Ikura, M., Kobayashi, R., 2000. Regulatory mechanism of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.* 275, 20090–20095. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002193200>
- Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H., Yuan, J., 1994. Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* 78, 739–750. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(94\)90422-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(94)90422-7)
- Yaffe, M.B., 2002. How do 14-3-3 proteins work? Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett.* 513, 53–57.
[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)03288-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)03288-4)

Přehled publikační činnosti

Původní vědecké práce *in extenso*, které jsou podkladem disertace:

1. **Kalabova, D.**, Smidova, A., Petrvalská, 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. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.116>

IF²⁰¹⁷ = 2.559

2. 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.

<https://doi.org/10.1111/febs.14670>

IF²⁰¹⁸ = 4.739

3. **Kalabova, D.***, Filandr, F.*, Alblova, M., Petrvalská, O., Horvath, M., Man, P., Obsil, T., Obsilova, V., 2020. 14-3-3 protein binding blocks the dimerization interface of caspase-2. *FEBS J* 287, 3494–3510. <https://doi.org/10.1111/febs.15215>

IF²⁰²⁰ = 5.542

4. Psenakova, K., Petrvalská, O., Kylarova, S., Lentini Santo, D., **Kalabova, D.**, Herman, P., Obsilova, V., Obsil, T., 2018. 14-3-3 protein directly interacts with the kinase domain of calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMKK2). *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1862, 1612–1625.

<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.04.006>

IF²⁰¹⁸ = 3.681

* sdílené první autorství

Původní vědecké práce *in extenso* bez vztahu k tématu disertace:

5. 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.

<https://doi.org/10.33549/physiolres.933950>

IF²⁰¹⁹ = 1.655

Plakátová sdělení na odborných setkáních:

- 12th International Congress of Cell Biology, 21. – 25. 7. 2016, Praha, ČR
- Mitochondria, Apoptosis and Cancer, 16. - 18. 9. 2017, Bled, Slovinsko
- XV. Discussions in Structural Molecular Biology, 22. - 24. 3. 2018, Nové Hradky, ČR
- The Protein Society 32nd Annual Symposium, 9. - 12. 7. 2018, Boston, USA
- The 44th FEBS Congress, 6. - 11. 7. 2019, Krakov, Polsko