

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Fyzikální chemie



Mgr. Lenka Řežábková

Studium úlohy proteinů 14-3-3 v regulaci G-proteinové signalizace

Role of the 14-3-3 proteins in the regulation of G-protein signaling

Disertační práce

Školitel: doc. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.

Konzultanti: doc. RNDr. Petr Heřman, CSc.

doc. RNDr. Jaroslav Večeř, CSc.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 1.10.2012

Podpis

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem studentům a pracovníkům naší a všech spolupracujících laboratoří za vytvoření velmi příjemného pracovního prostředí.

Největší dík patří mému školiteli doc. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, cenné rady, věnovaný čas a energii, které mi během mé práce poskytl.

Dále děkuji doc. RNDr. Jaroslavu Večeřovi, CSc., a doc. RNDr. Petru Heřmanovi, CSc., z Fyzikálního ústavu Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy za pomoc při měření časově-rozlišené fluorescence a mnoho rad týkajících se fluorescenčních měření a vyhodnocování dat. Taktéž děkuji doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu AV ČR za hmotnostně-spektrometrická měření a RNDr. Petru Manovi, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu AV ČR za spolupráci při měření H/D výměny spojené s hmotnostní spektrometrií.

Můj velký dík patří také vedoucí oddělení Proteinových struktur Fyziologického ústavu AV ČR RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D., za přátelský přístup a finanční podporu.

Ze všeho nejvíce však děkuji svým rodičům za jejich podporu a všestrannou pomoc, kterou mi poskytovali po celou dobu mého studia.

V neposlední řadě děkuji Grantové agentuře University Karlovy (projekt 28510), Grantové agentuře České republiky (projekt P305/11/0708) a Grantové agentuře AV ČR (projekt IAA501110801) za finanční podporu.

Abstract

The 14-3-3 family of phosphoserine/phosphothreonine-binding proteins dynamically regulates the activity of their binding partners in various signaling pathways that control diverse physiological and pathological processes such as signal transduction, metabolic pathways, cell cycle and apoptosis. More than 300 different cellular proteins from diverse eukaryotic organisms have been described as binding partners for the 14-3-3 proteins.

During my Ph.D., I was particularly interested in the role of 14-3-3 proteins in the regulation of G protein signaling pathway. The 14-3-3 proteins affect the G protein signaling via the interaction with negative regulators of G protein cascade – the RGS proteins and phosducin. I employed both biochemical and biophysical approaches to understand how the activity and function of RGS3/14-3-3 and phosducin/14-3-3 complexes are regulated.

I solved the low-resolution solution structure of RGS3/14-3-3 protein complex that shows the RGS domain of RGS3 bound to the 14-3-3 dimer in a unique manner by interacting with less-conserved regions on the outer surface of the 14-3-3 dimer outside its central channel. This was the first experimental evidence showing that the 14-3-3 protein directly interacts with its binding partner using regions other than that of the central channel. The involvement of such less-conserved regions may provide a general explanation for the observed isoform-specific interactions between 14-3-3 and their ligands. The structure of the RGS3/14-3-3 complex also provides an explanation for the 14-3-3-dependent inhibition of RGS3 function. It shows that the 14-3-3 protein, besides binding to the phosphorylated N terminal 14-3-3 binding motif, interacts with the C terminal RGS domain in close proximity to the $G\alpha$ -binding interface, and hence can sterically occlude it. In addition, the time resolved fluorescence measurements indicate that the 14-3-3 protein binding causes significant conformational changes of the RGS domain structure within its $G\alpha$ -interacting portion.

To gain insight into the role of 14-3-3 in the regulation of phosducin function, I studied structural changes of phosducin induced by phosphorylation and the 14-3-3 protein binding using time-resolved fluorescence spectroscopy. I provided the structural explanation for the 14-3-3-dependent inhibition of phosducin function.

Abstrakt

Proteiny 14-3-3 skrze vazbu na více jak 300 rozličných, především fosforylovaných, proteinů regulují značné množství biologicky významných dějů, např. apoptosu, buněčný cyklus, přenos signálu či metabolické dráhy.

V rámci svého Ph.D. studia jsem se zabývala úlohou proteinů 14-3-3 v regulaci G proteinové signalizace. Proteiny 14-3-3 ovlivňují G proteinovou dráhu skrze interakci s negativními regulátory G proteinové kaskády – proteiny RGS a fosducinem. Tato disertační práce si klade za cíl pomocí rozličných biochemických a biofyzikálních metod pochopit strukturní podstatu mechanismu, kterým fosforylace a vazba proteinů 14-3-3 reguluje biologickou aktivitu a funkci proteinů RGS3 a fosducinu.

Povedlo se mi vyřešit strukturu komplexu RGS3/14-3-3 s nízkým rozlišením, která ukázala, že RGS doména proteinu RGS3 interaguje s málo konzervovanou oblastí proteinu 14-3-3 nacházející se mimo centrální kanál. Tato struktura společně s daty z časově-rozlišené fluorescence vysvětlují mechanismus jakým vazba proteinu 14-3-3 na protein RGS3 blokuje interakci mezi proteinem RGS3 a $G\alpha$ podjednotkou. Vazba proteinu 14-3-3 jednak tuto interakci stericky blokuje a navíc způsobuje signifikantní konformační změnu RGS domény v okolí cysteinu 456, který je součástí interakčního povrchu s $G\alpha$ podjednotkou. Interakce RGS domény s málo konzervovanou oblastí proteinu 14-3-3 na vnější straně dimeru je prvním strukturním důkazem, že vazební partneři proteinu 14-3-3 interagují nejen s centrálním kanálem ale i s ostatními částmi proteinu 14-3-3. To může vysvětlovat specifitu, kterou vazební partneři vykazují ve výběru isoformy proteinu 14-3-3, na kterou se váží.

Pro pochopení úlohy, kterou proteiny 14-3-3 hrají v regulaci funkce fosducinu jsem pomocí metody časově-rozlišené fluorescenční spektroskopie studovala konformační změny fosducinu způsobené fosforylací a vazbou proteinu 14-3-3. Na základě těchto dat jsem vysvětlila strukturní podstatu mechanismu, kterým proteiny 14-3-3 inhibují funkci fosforylovaného fosducinu.

Seznam použitých zkratek

1,5-IAEDANS	5-(((2- iodoacetyl)amino)ethyl)amino) naphthalen-1-sulfonová kyselina
5-IAF	5-iodoacetamidofluorescein
AANAT	serotonin N-acetyltransferasa
ATP	adenosin trifosfát
AV ČR	Akademie věd České republiky
BMH1, BMH2	kvasničné isoformy proteinu 14-3-3
CAMKII	Ca ²⁺ /kalmodulin dependentní kinasa II
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CD	cirkulární dichroism
cGMP	cyklický guanosin monofosfát
DEAE	diethylaminoethyl
DESY	synchrotron v Hamburku, Německo („Deutsches Elektronen Synchrotron“)
D _{max}	maximální vzdálenost v rámci čáscice
ESI	ionizace elektrosprejem
FT-ICR	analyzátor cyklotronové rezonance iontů pomocí fourierovy transformace („Fourier transform ion cyclotron resonance“)
GAIP	protein interagující s Gα („Gα interacting protein“)
GAP	protein aktivující GTP („GTPase activating protein“)
GDP	guaninnukleotid difosfát
GF143	rostlinný protein 14-3-3
GGL doména	doména připomínající Gγ (Gγ-like domain)
GPCR	receptory spojené s G proteiny („G protein coupled receptor“)
GTP	guaninnukleotid trifosfát
G _{αβγ}	G protein transducinu
Gα, Gβ, Gγ	Gα, Gβ, Gγ podjednotka G proteinu
H/D výměna	výměna vodíků za deuteria
IPTG	isopropyl-β-D- thio-galaktopyranosid
IRDP	protein vázající retinoidy („retinoid binding protein“)
MALDI-TOF	metoda hmotnostní spektrometrie („Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight“)
MAPK	kinasa aktivovaná mitogenem („mitogen activated protein kinase“)
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
pD	pH deuterovaného roztoku
PDE	fosfodiesterasa
PKA	proteinkinasa A
PKC	proteinkinasa C

R_g	gyrační poloměr
RGS	regulátor G-proteinové signalizace
rpm	otáčky za minutu („revolutions per minute“)
SVD-MEM	metoda maximalni entropie („singular value decomposition – maximum entropy method“)
u	unit, tj. jednotka katalické aktivity
v/v	objemový zlomek
w/v	hmotnostní zlomek

Obsah

1. Úvod.....	13
2. Literární přehled.....	15
2.1 Proteiny 14-3-3.....	16
2.1.1 Vazební partneři a funkce proteinů 14-3-3.....	16
2.1.2 Struktura proteinů 14-3-3.....	17
2.1.3 C terminální segment a jeho role v autoregulaci proteinů 14-3-3.....	20
2.2 Proteiny RGS.....	21
2.2.1 Rozdělení savčích RGS proteinů.....	23
2.2.2 Struktura RGS domény a její vazba na G α podjednotku G proteinu.....	23
2.2.3 Regulace RGS proteinů.....	25
2.2.4 Úloha proteinu 14-3-3 v regulaci G-proteinové signalizace: vazba na protein RGS.....	27
2.3 Fosducin.....	29
2.3.1 Struktura fosducinu a jeho vazba na G $\beta\gamma$ podjednotku G proteinu.....	30
2.3.2 Úloha fosducinu v biochemii vidění: vliv fosforylace a vazby proteinu 14-3-3.....	31
2.3.3 Další funkce fosducinu.....	33
3. Cíle práce.....	36
4. Materiály a metody.....	38
4.1 Expres a purifikace proteinů.....	39
4.1.1 Protein RGS3.....	39
4.1.2 Protein fosducin.....	39
4.1.3 Protein 14-3-3.....	40
4.2 Modifikace pomocí fluorescenčních sond.....	40
4.3 <i>In vitro</i> fosforylace.....	41
4.4 Analytická ultracentrifugace.....	41
4.5 Časově-rozlišená fluorescence.....	42
4.5.1 Časově-rozlišené měření dohasínání intenzity fluorescence.....	43
4.5.2 Časově-rozlišené měření dohasínání anisotropie fluorescence.....	43
4.5.3 Měření Försterova rezonančního přenosu energie.....	44
4.6 H/D výměna spojená s hmotnostní spektrometrií.....	45
4.7 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření.....	45
5. Výsledky a diskuse.....	47
5.1 Vliv vazby proteinu 14-3-3 na RGS doménu Regulátoru G-proteinové signalizace (RGS3) – publikace I.....	48

5.2 Struktura komplexu RGS3/14-3-3: Proč vazba proteinu 14-3-3 inhibuje funkci regulátoru G-proteinové signalizace 3 (RGS3)? – publikace II.....	50
5.3 Strukturní změny fosducinu způsobené fosforylací a vazbou proteinu 14-3-3 - publikace III ...	52
5.4 Studium funkce a vlastností C terminálního segmentu kvasničných isoform proteinu 14-3-3 (BMH1 a BMH2) - publikace IV	55
6. Závěr.....	57
7. Seznam citované literatury	60
8. Publikace	68
8.1 Příloha 1: Vliv vazby proteinu 14-3-3 na RGS doménu Regulátoru G-proteinové signalizace (RGS3).	69
8.2 Příloha 2: Struktura komplexu RGS3/14-3-3: Proč vazba proteinu 14-3-3 inhibuje funkci regulátoru G-proteinové signalizace 3 (RGS3)?	81
8.3 Příloha 3: Strukturní změny fosducinu způsobené fosforylací a vazbou proteinu 14-3-3.....	98
8.4 Příloha 4: Studium funkce a vlastností C terminálního segmentu kvasničných isoform proteinu 14-3-3 (BMH1 a BMH2).....	121

Tato práce vznikla na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze a na oddělení Proteinových struktur Fyziologického ústavu Akademie věd České Republiky. Tato disertační práce je založena na následujících publikacích (jejich kopie jsou uvedeny v příloze):

I. **Rezabkova, L.**, Boura, E., Herman, P., Vecer, J., Bourova, L., Sulc, M., Svoboda, P., Obsilova, V., Obsil, T. (2010) 14-3-3 protein interacts with and affects the structure of RGS domain of regulator of G protein signaling 3 (RGS3). *J Struct Biol* 170, 451-461.

II. **Rezabkova, L.**, Man, P., Novak, P., Herman, P., Vecer, J., Obsilova, V., Obsil, T. (2011) Structural basis for the 14-3-3 protein-dependent inhibition of the regulator of G protein signaling 3 (RGS3) function. *J Biol Chem* 286, 43527-43536.

III. **Rezabkova, L.**, Kacirova, M., Sulc, M., Herman, P., Vecer, J., Stepanek, M., Obsilova, V., Obsil, T. (2012) Structural modulation of phosphocucinin by phosphorylation and the 14-3-3 protein binding. *Biophys. J.*, přijato k otištění

IV. Veisova, D., **Rezabkova, 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.

Další publikace autorky, které nejsou součástí této práce:

Veisova, D., Macakova, E., **Rezabkova, 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.

Boura, E., **Rezabkova, L.**, Brynda, J., Obsilova, V., Obsil, T. (2010) Structure of the human FOXO4-DBD-DNA complex at 1.9 Å resolution reveals new details of FOXO binding to the DNA. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 1351-1357.

Rety, S., **Rezabkova, L.**, Dubanchet, B., Silhan, J., Legrand, P., Lewit-Bentley, A. (2010) Structural studies of the catalytic core of the primate foamy virus (PFV-1) integrase. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 66, 881-886.

1. Úvod

Předkládaná práce je součástí širšího projektu laboratoře doc. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D. V rámci tohoto projektu studujeme molekulární mechanismy regulace proteinů v závislosti na jejich fosforylaci a vazbě proteinů 14-3-3. V této disertační práci jsem se konkrétně zabývala úlohou proteinů 14-3-3 v regulaci G-proteinové signalizace.

G-proteinová signální dráha hraje klíčovou roli v přenosu signálu přes plasmatickou membránu a je nezbytná pro všechny aspekty buněčné a orgánové fyziologie. Mnoho lidských nemocí je způsobeno odchylkou v G-proteinové dráze a terapeutický efekt velkého množství současných léků je zacílen právě na některou z komponent G-proteinové signalizace.

Aby tato signální kaskáda mohla správně plnit svoji nesmírně důležitou úlohu v buňce, je nutné, aby efektivně fungovala její regulace. K regulaci může docházet buď na úrovni receptorů spojených s G proteinem, nebo na úrovni samotných G proteinů. Jsou známy dva mechanismy, kterými je tato dráha negativně regulována na úrovni G proteinů:

- Vazba fosducinu na $G\beta\gamma$ podjednotku heterotrimerní G proteinu, čímž je zabráněno opětovnému spojení $G\beta\gamma$ s $G\alpha$.
- Vazba proteinu RGS na aktivovanou $G\alpha$ -GTP podjednotku heterotrimerního G proteinu. Tato vazba způsobí urychlení hydrolýzy GTP.

Proteiny RGS a fosducin jsou ovšem samy regulovány fosforylací a vazbou proteinů 14-3-3. Proteiny 14-3-3 jsou dimerní, vysoce konzervované regulační proteiny, které se hojně exprimují ve všech eukaryotických organismech. Skrze vazbu na více jak 300 rozličných, především fosforylovaných, proteinů regulují značné množství biologicky významných dějů, např. apoptosu, buněčný cyklus, přenos signálu či metabolické dráhy.

Přestože jsou proteiny 14-3-3 středem zájmu mnoha vědeckých skupin po celém světě, znalosti o strukturních mechanismech, kterými tyto proteiny regulují své vazebné partnery, jsou minimální a odhalovány jen po malých krůčcích. Jejich úloha v regulaci G-proteinové signalizace je klíčová pro správnou funkci této veledůležité dráhy. Tato disertační práce si klade za cíl pomocí rozličných biochemických a biofyzikálních metod pochopit strukturní podstatu mechanismu, kterým fosforylace a vazba proteinů 14-3-3 reguluje biologickou aktivitu a funkci proteinů RGS3 a fosducinu.

2. Literární přehled

2.1 Proteiny 14-3-3

Proteiny 14-3-3 jsou středem zájmu mnoha vědeckých skupin především díky rozmanitosti biologických dějů, kterých se účastní. Hrají důležitou roli v buněčných procesech, jako je regulace apoptosy, buněčného cyklu, přenosu signálu či metabolických drah. Jde o dimerní, vysoce konzervované regulační proteiny, které se hojně exprimují ve všech eukaryotických organismech (Aitken et al., 1992; Ferl et al., 2002). Poprvé byly identifikovány v 60. letech minulého století při analýze proteinů exprimovaných v mozkové tkáni. Neobvyklý název „14-3-3“ odráží čísla, které měla frakce při separaci pomocí dvoudimensionální DEAE-celulosové chromatografie a škrobové elektroforézy (Moore and McGregor, 1965). Od té doby bylo identifikováno několik isoform těchto proteinů. Zatímco kvasinky exprimují pouze dvě (BMH1, BMH2), u savců bylo identifikováno nejméně 7 isoform (β , γ , ϵ , σ , ζ , τ , η). Fosforylované formy β a γ byly zpočátku popsány jako isoformy α a δ (Aitken et al., 1995). U rostlin bylo zatím objeveno 15 isoform (Rosenquist et al., 2001).

2.1.1 Vazební partneři a funkce proteinů 14-3-3

Doposavad bylo identifikováno více jak 300 vazebných partnerů proteinů 14-3-3. Mezi významné vazebné partnery patří proteinové kinasy (např. PKC (Van Der Hoeven et al., 2000), ASK1 (Zhang et al., 1999)), fosfatasy (např. Cdc25A (Conklin et al., 1995)), regulátory G-proteinové signalizace (např. RGS3 (Benzing et al., 2000), fosducin (Nakano et al., 2001)), enzymy (např. serotonin N-acetyltransferasa (Ganguly et al., 2001), tryptofanhydroxylasa, tyrosinhydroxylasa (Ichimura et al., 1988)), také některé strukturní a cytoskeletární proteiny, receptory, proteiny účastnící se regulace buněčného cyklu a apoptózy (van Hemert et al., 2001). Díky vysokému počtu vazebných partnerů hrají proteiny 14-3-3 důležitou roli v mnoha buněčných procesech jako je regulace apoptosy, buněčného cyklu, přenosu signálu, metabolických drah, diferenciace a proliferace buňky, transkripce, podílejí se na intracelulárním transportu, buněčné adhesi, či ovlivňují strukturu cytoskeletu (Gardino et al., 2006; Porter et al., 2006; Tzivion et al., 2006).

Analýza známých vazebných míst proteinů 14-3-3 společně s využitím peptidových knihoven umožnila definovat dva vysoce afinitní fosforylačně-dependentní vazebné motivy, které jsou rozeznávány všemi isoformami 14-3-3: RSXpSXP (motiv 1) a RXYpSXP (motiv 2), kde X značí libovolnou aminokyselinu a pS fosforylovaný serinový zbytek (Rittinger et

al., 1999; Yaffe et al., 1997). Nedávno byla nalezena nová sekvence pS/pTX₁₋₂COOH navržená jako motiv 3 (Ganguly et al., 2005). Navíc se ukázalo, že proteiny 14-3-3 jsou schopny vázat i některé nefosforylované vazebné partnery (Aitken et al., 2002).

Funkce 14-3-3 proteinů bývá nejčastěji klasifikována do tří skupin podle toho, jakým způsobem regulují svého vazebného partnera (Bridges and Moorhead, 2004):

1) *Proteiny 14-3-3 mění konformaci svého vazebného partnera.* Dimerní struktura proteinu 14-3-3 je velmi rigidní, přesto je schopna vázat velké množství rozličných vazebných partnerů. Bylo proto navrženo, že po vazbě na protein 14-3-3 může dojít ke změně konformace jeho vazebného partnera, zatímco konformace proteinu 14-3-3 zůstane nezměněna (Yaffe, 2002). Příkladem tohoto typu modulace je aktivace serotonin N-acetyltransferasy (AANAT). Tento enzym je sám osobě katalyticky neaktivní především díky nízké afinitě k substrátu. Nicméně po fosforylaci tohoto enzymu dojde k navázání proteinu 14-3-3, který stabilizuje oblast molekuly AANAT odpovědnou za vazbu substrátu. Tato strukturní stabilizace zvýší afinitu pro substrát přibližně desetkrát a tak tento enzym aktivuje (Ganguly et al., 2001; Obsil et al., 2001).

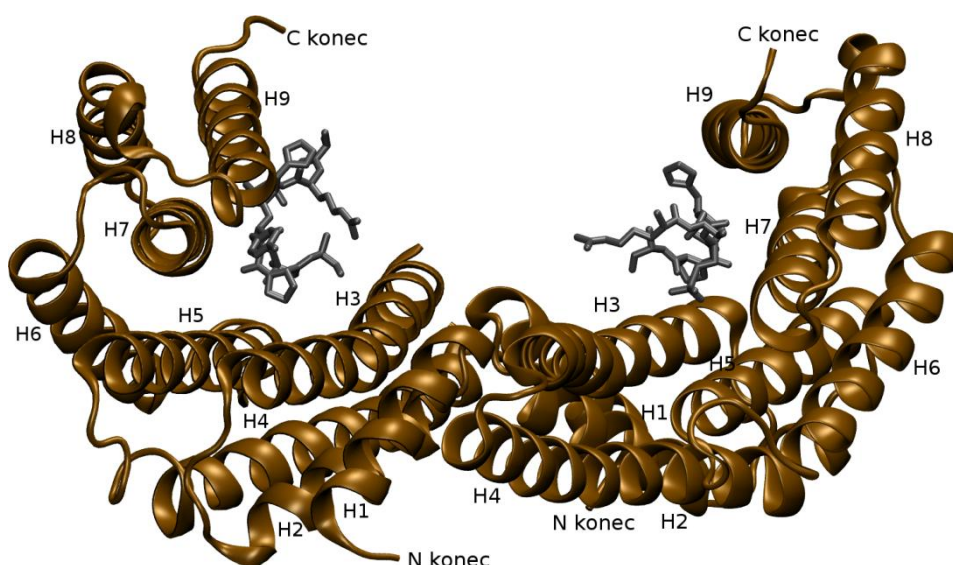
2) *Proteiny 14-3-3 stericky blokují důležité oblasti svých vazebných partnerů.* Proteiny 14-3-3 mohou po vazbě na svého partnera kontrolovat jeho buněčnou lokalizaci, např. 14-3-3 protein odkrývá či zakrývá jadernou signální sekvence u FOXO transkripčních faktorů, čímž může regulovat jejich pohyb mezi cytoplasmou a jádrem (Van Der Heide et al., 2004).

3) *Proteiny 14-3-3 mohou fungovat jako adaptorové proteiny.* Třetí možná funkce proteinů 14-3-3 je jejich schopnost sloužit jako adaptorová molekula. Může tedy nastat situace, kdy každý monomer proteinu 14-3-3 interaguje s jiným vábeným partnerem. Tím je zajištěno, že se dva různé proteiny octnou po dostatečně dlouhou dobu ve vzájemné těsné blízkosti. Příkladem tohoto typu regulace je interakce proteinu 14-3-3 s glykogensyntaskinase 3 β a proteinem tau (Agarwal-Mawal et al., 2003).

2.1.2 Struktura proteinů 14-3-3

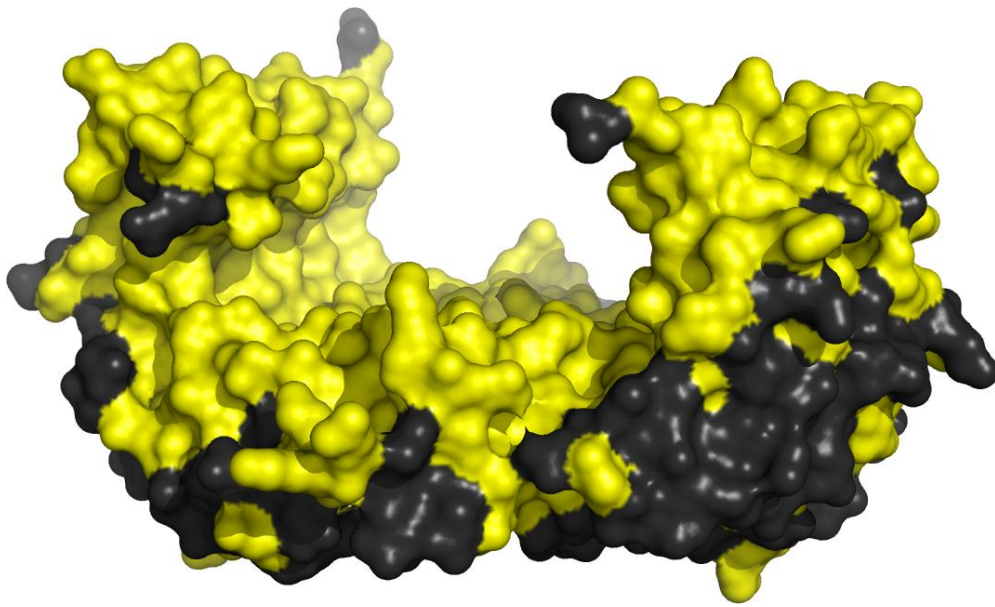
14-3-3 proteiny tvoří hetero- i homodimery (Jones et al., 1995) s výjimkou isoformy σ , která tvoří preferenčně homodimery (Wilker et al., 2005). První struktury proteinů 14-3-3 (isoformy ζ a τ) (Liu et al., 1995; Xiao et al., 1995) ukázaly, že každý monomer se skládá z devíti antiparalelních α -helixů (viz. Obr. 2.1). Molekula dimeru je tvaru písmene U a vytváří značně nabitý kanál, který obsahuje dvě vazebná místa pro své partnery. Dimer proteinu 14-3-

3 může tedy simultánně interagovat se dvěma motivy, které mohou být součástí jednoho či více vazebných partnerů (Obsil et al., 2001; Rittinger et al., 1999; Yaffe et al., 1997). Na tvorbě dimeru se podílejí helixy H3 a H4 jednoho monomeru a helixy H1 a H2 druhého monomeru. Vazebné místo je tvořeno helixy H3, H5, H7 a H9, respektive jejich aminokyselinovými zbytky, které jsou exponovány do centrálního kanálu (Liu et al., 1995; Xiao et al., 1995). Na vazbě fosfátové skupiny motivu klasického ligandu se podílí zejména lysin 49, arginin 56, arginin 127 a tyrosin 128, což jsou rezidua helixů H3 a H5 (číslování odpovídá lidské isoformě ζ) (Rittinger et al., 1999).



Obr. 2.1: Krystalová struktura dimerní formy proteinu 14-3-3 s navázanými fosfopeptidy (PDB kód: 1QJB) (Rittinger et al., 1999).

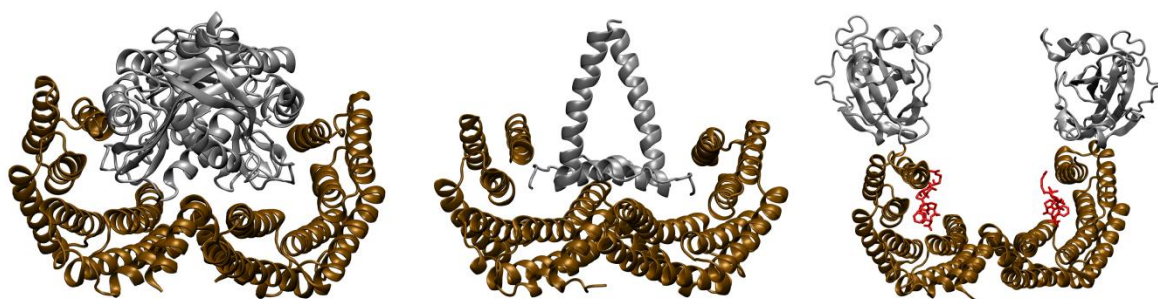
Dnes již je známá struktura všech sedmi savčích isoform (Yang et al., 2006). Oblasti, které jsou vysoce konzervované u všech isoform proteinu 14-3-3, se nacházejí především v oblasti centrálního kanálu. Méně konzervované aminokyselinové zbytky se nacházejí na vnější straně dimeru 14-3-3 (viz. Obr. 2.2). Navíc se za helixem H9 nachází oblast tzv. C terminálního konce, která je velmi sekvenčně rozmanitá a jeho struktura nebyla doposud identifikována na žádné z publikovaných struktur proteinů 14-3-3 a předpokládá se, že je velmi flexibilní (<http://www.rcsb.org/pdb>). Přes vysokou konzervaci aminokyselinových zbytků v oblasti centrálního kanálu, kterou sdílí všechny isoformy proteinu 14-3-3, vykazuje velké množství vazebných partnerů značnou specifitu ve výběru isoformy, na kterou se váží (Gardino et al., 2006).



Obr. 2.2: Krystalová struktura dimerní formy proteinu 14-3-3 obarvená podle konzervovanosti aminokyselinových zbytků. Žlutě jsou znázorněny aminokyselinové zbytky, které jsou mezi savčími isoformami proteinu 14-3-3 absolutně konzervované (Rittinger et al., 1999).

Struktura samotného proteinu 14-3-3, případně proteinu 14-3-3 v komplexu s krátkými peptidy je velice dobře známá (<http://www.rcsb.org/pdb>). Bohužel stále ještě chybí struktury, kde by byl protein 14-3-3 v komplexu s celým vazebným partnerem. Takové struktury existují pouze tři, což je velmi málo, vezmeme-li v úvahu, že vazebných partnerů je známo více jak 300. Jedná se o krystalovou strukturu proteinu 14-3-3 v komplexu s serotonin N-acetyl transferasou (AANAT) (Obsil et al., 2001), dále pak o krystalovou strukturu proteinu 14-3-3 v komplexu s N terminální částí H^+ -ATPasy (Ottmann et al., 2007) a o krystalovou strukturu komplexu rostlinného proteinu 14-3-3 (GF14c) s florigenem Hd3a a fosforylovaným peptidem odvozeným z transkripčního faktoru OsFD1 (viz. Obr. 2.3). Poslední jmenovaná struktura ukázala, že „klasická“ představa o interakcích proteinů 14-3-3, kdy se vazebný partner nachází v centrálním kanálu, není úplná. Florigen Hd3a se váže na helixy H8 a H9 proteinu 14-3-3 nezávisle na fosforylaci bez jakékoli interakce v rámci centrálního kanálu proteinu 14-3-3. Tam se naopak váže další tentokrát fosforylovaný transkripční faktor OsFD1 (Taoka et al., 2011). Další strukturální informace poskytují 3D modely komplexů navržených v naší laboratoři. Jedná se o model komplexu FOXO4/14-3-3 založený na měření vzdáleností technikou Försterova rezonančního přenosu energie (Silhan et al., 2009) a dále o model kom-

plexu RGS3/14-3-3, který byl navržen na základě dat z metod: malouhlový rozptyl rentgenového záření, H/D výměna spojená s hmotnostní spektrometrií a měření vzdáleností technikou Försterova rezonančního přenosu energie. Tento model komplexu RGS3/14-3-3 ukazuje, že RGS doména proteinu RGS3 interaguje s málo konzervovanou oblastí proteinu 14-3-3 nacházející se mimo centrální kanál (Rezabkova et al., 2011). Jednoznačně je vidět, že pro úplné pochopení mechanismů, kterými proteiny 14-3-3 regulují tak velké množství rozličných vazebných partnerů a pro porozumění specifiky, se kterou si interakční partneři vybírají isoformu 14-3-3, na kterou se naváží, by bylo potřeba vyřešit další struktury proteinu 14-3-3 v komplexu nejen s krátkým peptidem nýbrž s celým vazebným partnerem.



Obr. 2.3: Krystalové struktury komplexů proteinů 14-3-3. Vlevo: krystalová struktura komplexu AA-NAT/14-3-3 (PDB kód: 1IB1) (Obsil et al., 2001), uprostřed: krystalová struktura komplexu H⁺-ATPasa/14-3-3 (PDB kód: 2O98) (Ottmann et al., 2007), Vpravo: krystalová struktura komplexu Hd3a/OsFD1/GF14c (PDB kód: 3AXY) (Taoka et al., 2011).

2.1.3 C terminální segment a jeho role v autoregulaci proteinů 14-3-3

Všechny isoformy proteinu 14-3-3 jsou vysoce sekvenčně konzervované a značně rigidní, výjimkou je C terminální konec molekuly, který je značně variabilní a vysoce flexibilní. Navíc hraje důležitou roli v autoregulaci u savčích isoform proteinů 14-3-3. Při testování různých variant ligandu Raf-1 kinasy a apoptického proteinu BAD se zjistilo, že po odstranění C terminálního konce dochází ke zvýšené afinitě vazby těchto ligandů (Truong et al., 2002). Následkem toho byla navržena teorie, která předpokládá, že C terminální konec hraje úlohu jakéhosi autoinhibitoru vstupu nescifického ligandu do vazebného kanálu. Před navázáním ligandu se C terminální segment nachází uvnitř vazebného kanálu a vazba ligandu způsobí jeho „vymrštění“ ven. Tyto procesy jsou citelně ovlivněny fosforylací na treoninovém zbytku

232 (číslování odpovídá lidské isoformě ζ), která inhibuje vazbu ligandu a snižuje pohyblivost C terminálního segmentu (Obsilova et al., 2004; Silhan et al., 2004).

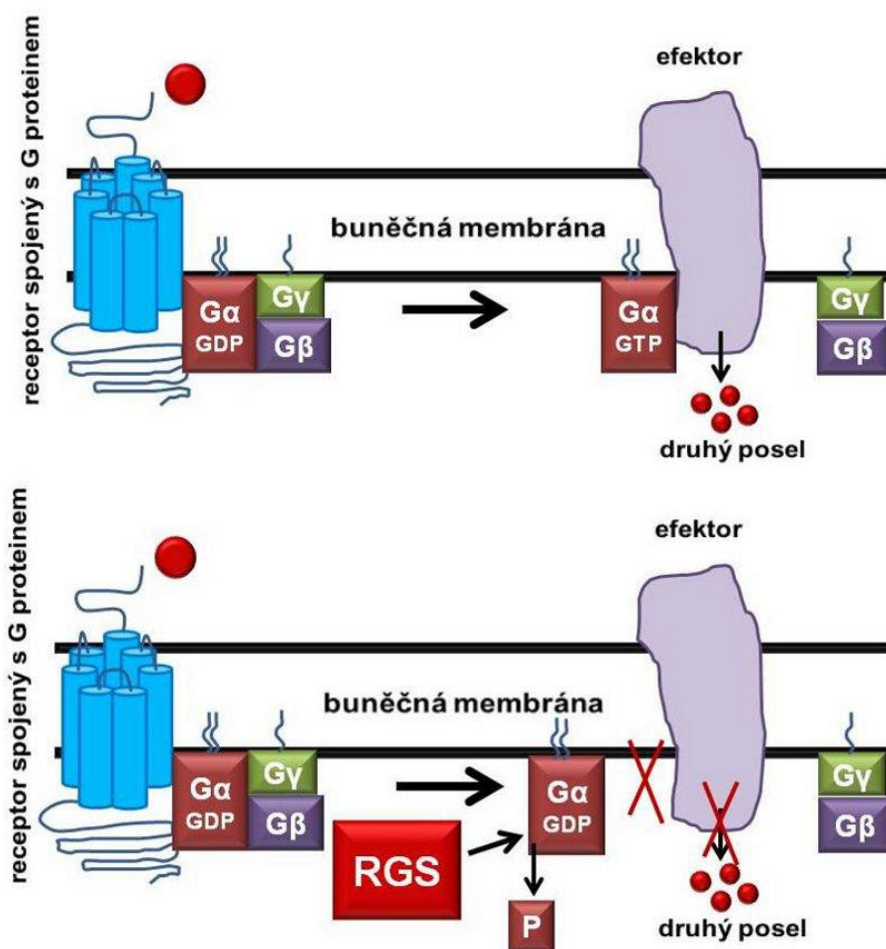
C terminální konec kvasničných isoform proteinu 14-3-3, BMH1 a BMH2, se od těch savčích liší ještě mnohem více. Jejich C terminální segment je delší a obsahuje polyglutaminovou sekvenci (17 za sebou jdoucích glutaminových zbytků), jejíž funkce je neznámá (van Heusden and Steensma, 2006). Studium tohoto segmentu u kvasničných isoform naznačilo, že jeho odstranění nemá vliv na vazbu ligandu. Pomocí rozličných biofyzikálních technik bylo ukázáno, že na rozdíl od savčích isoform se C terminální segment nenachází ve vazebném žlábků. C terminální konec kvasničných isoform tedy na rozdíl od savčích nejspíše neplní funkci autoinhibitoru (Veisova et al., 2010).

2.2 Proteiny RGS

G-proteinová signální dráha je klíčovou složkou mnoha fyziologických procesů, jako je vidění, čich, přenos nervových vzruchů, imunologická odpověď, či kardiovaskulární funkce. Tato dráha se skládá z receptorů spojených s G proteiny (GPCR), G proteinů a signál generujících efektorů. G proteiny se skládají z α , β a γ podjednotky, kde $G\alpha$ podjednotka je schopna vázat a hydrolyzovat guaninové nukleotidy. Navázáním ligandu jako je např. adrenalin, noradrenalin, histamin, serotonin nebo parathormon na receptory spojené s G proteiny dojde k jejich konformační změně, čímž je aktivován G protein. Aktivace způsobí uvolnění GDP z $G\alpha$ podjednotky a jeho výměnu za GTP. Navázání GTP dále způsobí konformační změny G proteinu, které vyústí disociací $G\beta\gamma$ podjednotky. $G\alpha$ -GTP i $G\beta\gamma$ regulují aktivitu cílových efektorů, které dále mobilizují druhé posly. Deaktivace vyžaduje hydrolyzu GTP, čímž se posune rovnováha ve prospěch opětovného spojení podjednotek a dojde tak k přerušení přenosu signálu (Krauss, 2001).

Bylo zjištěno, že vlastní GTPasová aktivita $G\alpha$ podjednotky *in vitro* je výrazně nižší než rychlost deaktivace některých signálů zprostředkovaných G proteiny *in vivo*. Tento paradox poukázal na to, že se procesu deaktivace účastní ještě další faktory. Byla popsána nová rodina proteinů, **Regulátory G-proteinové Signalizace** (proteiny RGS), které se přímo váží na aktivovanou $G\alpha$ -GTP podjednotku a urychlují hydrolyzu GTP (stabilizují transientní stav). Jsou tedy limitující pro životnost $G\alpha$ -GTP a ukončují přenos signálu (*viz. Obr. 2.4*) (Siderovski et al., 1996; Watson et al., 1996).

Proteiny RGS byly objeveny díky genetickým studiím G proteinových signálních drah prováděných v modelových organismech. Velký význam těmto proteinům začal být přikládán v roce 1996, kdy bylo na základě sekvenčních homologií s konzervovanou 120 aminokyselinovou doménou v Sst2 proteinech *Saccharomyces cerevisiae* a EGL-10 proteinech *Caenorhabditis elegans*, identifikováno kolem 20 různých členů RGS rodiny (Koelle and Horvitz, 1996; Siderovski et al., 1996). Dnes jsou proteiny RGS hojně studovány, jelikož jsou jako negativní regulátory G-proteinové signalizace slibným cílem nových medikamentů.



Obr. 2.4: Navázáním hormonu či neurotransmiteru na receptor spojený s G proteinem dojde k aktivaci G proteinu (uvolnění GDP z $G\alpha$ podjednotky a jeho výměna za GTP + disociace $G\beta\gamma$ podjednotky). $G\alpha$ -GTP i $G\beta\gamma$ podjednotka mohou aktivovat efektor (nahore). V přítomnosti RGS (dole) však dojde k navázání tohoto proteinu na aktivovanou $G\alpha$ -GTP podjednotku, což způsobí urychlení hydrolyzy GTP. Proteiny RGS jsou tedy limitující pro životnost $G\alpha$ -GTP a ukončují přenos signálu (kresleno podle (Hepler, 1999)).

2.2.1 Rozdělení savčích RGS proteinů

Stejně jako mnoho dalších signálních proteinů tvoří proteiny RGS velkou a rozmanitou rodinu. Doposavad bylo u savců identifikováno více jak 30 proteinů patřících do RGS rodiny. Všechny proteiny RGS obsahují konzervovanou cca 120 aminokyselinovou RGS doménu, která je odpovědná za vazbu na aktivovanou $G\alpha$ -GTP podjednotku. Vně RGS domény jsou jednotliví členové RGS rodiny strukturně odlišní a mohou obsahovat další motivy či domény, které ovlivňují jejich cíl v buňce či interakci s dalšími vazebnými partnery. RGS proteiny se podle sekvenční homologie dělí do několika podrodin: R4 podrodina (RGS1, RGS2, RGS3, RGS4, RGS5, RGS8, RGS13, RGS16, RGS18, RGS21), RZ podrodina (RGS17, RGS19, RGS20), R7 podrodina (RGS6, RGS7, RGS9, RGS11), R12 podrodina (RGS10, RGS12, RGS14), RA podrodina (axin, axin2), GEF podrodina (p115-RhoGEF, LARG, PDZ-RhoGEF), GRK podrodina (GRK1, GRK2, GRK3, GRK4, GRK5, GRK6, GRK7) a SNX podrodina (SNX13, SNX14, SNX25) (Ross and Wilkie, 2000; Siderovski and Willard, 2005; Zheng et al., 1999).

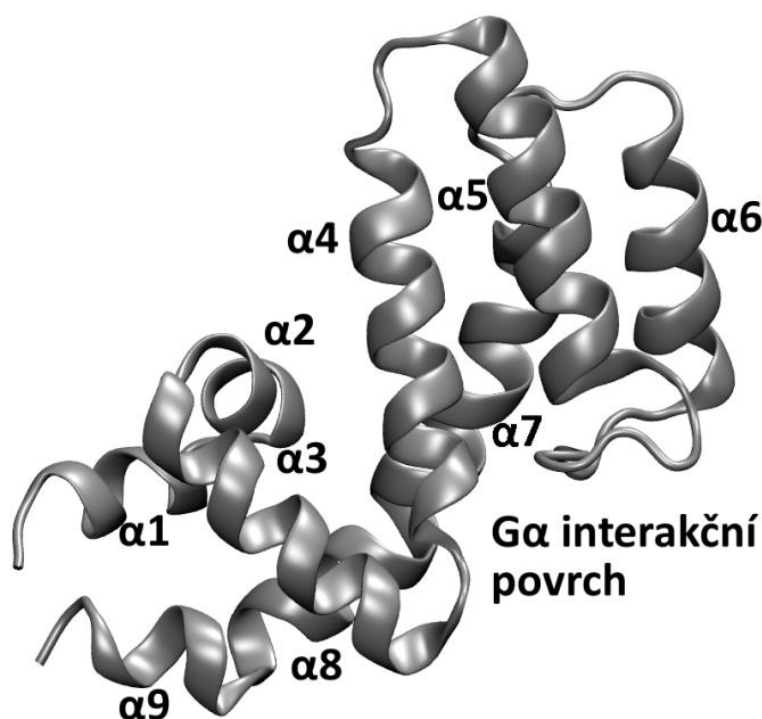
Členové R4 podrodiny a RZ podrodiny s výjimkou RGS3 a RET-RGS1 jsou malé (20-30 kDa) proteiny obsahující hlavně RGS doménu a pouze krátkou sekvenci vně této domény na C a N konci. Oproti tomu členové R7, R12 a RA podrodin s výjimkou RGS10 jsou mnohem větší proteiny (až 160 kDa), které vně RGS domény obsahují motivy či domény, skrze které interagují s dalšími proteiny. Např. členové R7 podrodiny jsou schopny skrze GGL doménu ($G\gamma$ -like domain) interagovat s $G\beta 5$ podjednotkou (Snow et al., 1998). Dále by se proteiny RGS daly rozdělit podle své distribuce v tkáních. Část proteinů RGS, např. RGS12, se vyskytuje v mnoha tkáních, dá se tedy předpokládat, že jejich funkce je zcela obecná (Snow et al., 1997). Naopak jiní členové se specificky vyskytují v určité tkáni a mohou tudíž mít zcela specifickou funkci, např. exprese RGS9 v retině nejspíše odráží jeho roli při přenosu signálu zprostředkovaného rodopsinem (He et al., 1998).

2.2.2 Struktura RGS domény a její vazba na $G\alpha$ podjednotku G proteinu

Za vazbu na $G\alpha$ podjednotku heterotrimerního G proteinu je odpovědná RGS doména proteinu RGS. Vazba RGS domény je schopna urychlit hydrolyzu GTP u členů $G\alpha_{i,1}$ rodiny ($G\alpha_{i,1}$, $G\alpha_{i,2}$, $G\alpha_{i,3}$, $G\alpha_0$, $G\alpha_t$, $G\alpha_z$) a také u $G\alpha_q$, ale nikdy nepůsobí na $G\alpha_s$ a $G\alpha_{12}$. Výjimečně interaguje protein RGS specificky pouze s jedním konkrétním typem $G\alpha$ podjed-

notky, např. protein RGS2 specificky váže $G\alpha_q$ podjednotku, ale obecně jsou jednotlivé proteiny RGS schopny ovlivňovat více členů $G\alpha_i$ a $G\alpha_q$ (Heximer et al., 1997; Kosloff et al., 2011; Soundararajan et al., 2008).

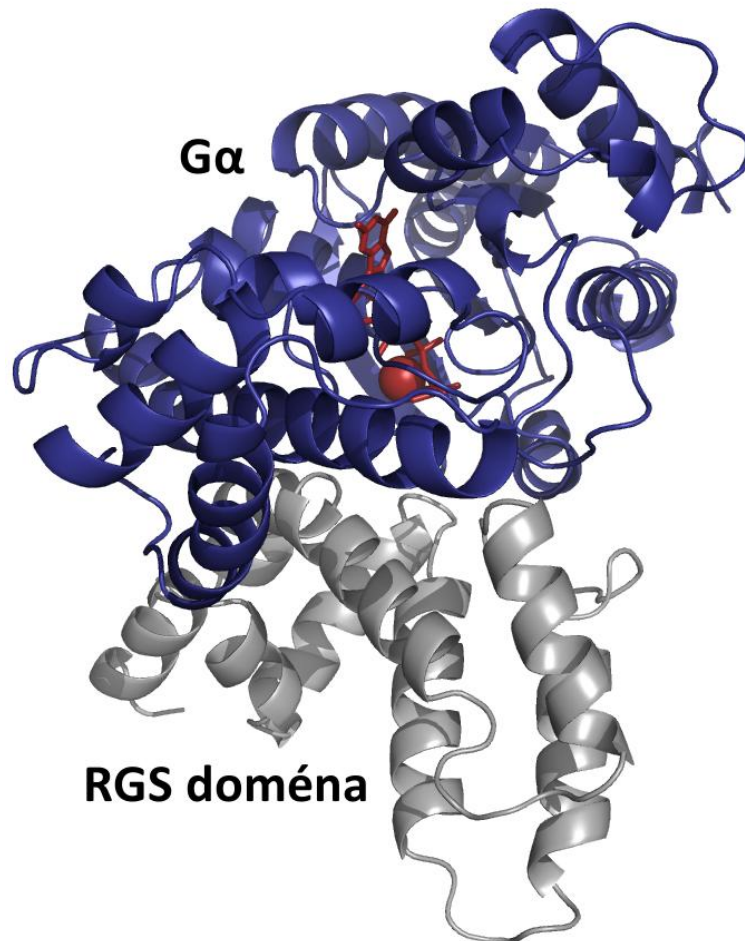
RGS doména se skládá přibližně ze 120 aminokyselin. Dnes je známa struktura RGS domén většiny proteinů RGS. RGS domény se u všech vyřešených struktur skládají z devíti α -helixů, které tvoří dvě menší poddomény. Terminální poddoména je tvořena helixy α_1 , α_2 , α_3 , α_8 a α_9 . Druhá větší poddoména se skládá z helixů α_4 , α_5 , α_6 a α_7 . Obě poddomény jsou důležité pro GTPasovou aktivitu RGS proteinů (viz. Obr. 2.5) (Rezabkova et al., 2010; Soundararajan et al., 2008).



Obr. 2.5: Struktura RGS domény proteinu RGS3 (PDB kód 2OJ4) (Rezabkova et al., 2010).

Dále byla vyřešena krystalová struktura RGS domény proteinu RGS4 v komplexu s $G\alpha_{i,1}$ - Mg^{2+} -GDP- AlF_4^- (viz. Obr. 2.6) (Tesmer et al., 1997). V tomto komplexu je $G\alpha_{i,1}$ navázána na GDP, AlF_4^- , Mg^{2+} a měla by proto mít podobnou strukturu jako $G\alpha$ podjednotka v blízkosti transientního stavu GTPasové reakce. RGS4 tedy urychluje hydrolýzu GTP především tak, že stabilizuje transientní stav.

Hlavní interakční povrch mezi proteiny RGS4 a $G\alpha_{i,1}$ tvoří tři oblasti: aminokyseliny 179-185 (oblast I), 204-213 (oblast II), 235-237 (oblast III). Tyto aminokyselinové zbytky jsou úzce spojeny s navázáním a hydrolyzou GTP a interagují s vysoce konzervovanými úseky proteinu RGS4 (Tesmer et al., 1997).



Obr. 2.6: Struktura RGS domény proteinu RGS4 v komplexu s $G\alpha_{i,1}$ (PDB kód: 1AGR) (Tesmer et al., 1997).

2.2.3 Regulace RGS proteinů

Proteiny RGS hrají klíčovou roli v regulaci G-proteinové dráhy. Jejich trvalá aktivita by však způsobila úplné zablokování G-proteinové signalizace, což by mělo fatální dopad na průběh mnoha nezbytných dějů v buňce. Regulační mechanismus proteinů RGS je tedy nesmírně důležitý pro správnou funkci G-proteinové kaskády. Mechanismů regulace je známo

několik: změna v expresi, změna buněčné lokalizace, posttranslační modifikace (fosforylace, palmitoylace), interakce s vazebnými partnery.

Významnou roli v regulaci proteinů RGS hraje fosforylace, která má vliv jak na intracelulární lokalizaci proteinů RGS tak na jejich interakci s $G\alpha$ -GTP podjednotkou a ostatními vazebnými partnery (Chidiac and Roy, 2003). Např. protein Sst2 z kvasinky může být fosforylován pomocí kinasy aktivované mitogenem (MAPK), což neovlivní jeho GTPasovou aktivitu, ale sníží rychlost jeho degradace (Garrison et al., 1999). Fosforylace RGS2 proteinu pomocí proteinkinasy C (PKC) (Cunningham et al., 2001) a RGS9-1 pomocí cAMP-dependentní proteinkinasy A (PKA) (Balasubramanian et al., 2001) oslabí jejich GTPasovou aktivitu. Naopak fosforylace proteinu interagujícího s $G\alpha$ (GAIP) pomocí MAPK (Ogier-Denis et al., 2000) jeho GTPasovou aktivitu zvýší. Pomocí fosforylace některých proteinů RGS může být ovlivněna lokalizace tohoto proteinu. Např. fosforylace RGS10 pomocí PKA neovlivní jeho GTPasovou aktivitu, ale způsobí translokaci z cytoplasmy do jádra (Burgon et al., 2001). Velký význam hraje fosforylace při interakci s vazebnými partnery. Např. proteiny RGS3, RGS7, či RGS18 se po fosforylaci váží na proteiny 14-3-3. Vazba proteinu 14-3-3 blokuje interakci mezi proteinem RGS a aktivovanou $G\alpha$ -GTP podjednotkou (Benzing et al., 2002; Benzing et al., 2000; Gegenbauer et al., 2012; Niu et al., 2002).

Dalším známým mechanismem je regulace exprese jednotlivých proteinů RGS. Bylo ukázáno, že stimulace buněk agonisty aktivující $G\alpha_q$ nebo $G\alpha_i$ vede ke zvýšení exprese některých proteinů RGS, např. carbachol stimuluje expresi proteinu RGS2 (Song et al., 1999), angiotensin II zvyšuje expresi u RGS4 (Romero et al., 2007), endothelin-1 u RGS16 (Stuebe et al., 2008), atd. Dalšími známými faktory ovlivňujícími expresi proteinů RGS jsou cytokiny, např. interferon- β zvyšuje expresi u RGS1 (Tran et al., 2010) a RGS2 (Giorelli et al., 2002), interleukin-17 u RGS16 (Xie et al., 2010), atd.

Zmíněné příklady ukazují, že regulace proteinů RGS probíhá na mnoha úrovních a je značně komplexní. Tato komplexita umožňuje velmi flexibilní kontrolu funkce G proteinů. Vzhledem k tomu, že proteiny RGS hrají důležitou roli v různých stádiích rozličných patologických stavů, jako jsou kardiovaskulární nemoci, poruchy nervového systému, či různé druhy rakoviny (Sjogren et al., 2010; Zhang and Mende, 2011), dá se předpokládat, že studium regulace proteinů RGS bude i nadále středem zájmu mnoha vědeckých skupin a její hlubší pochopení by mohlo pomoci při hledání nových, vhodných léčiv zacílených právě na proteiny RGS.

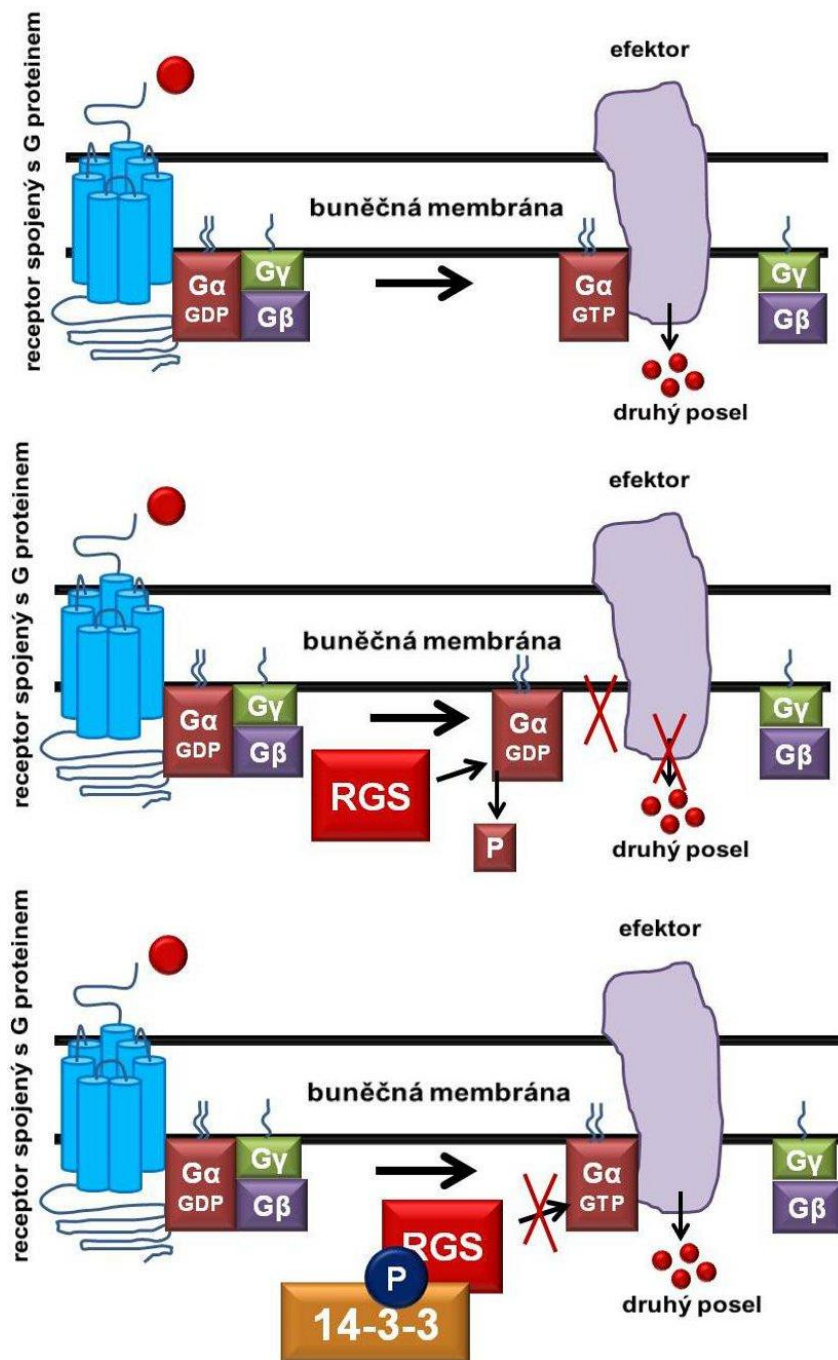
2.2.4 Úloha proteinu 14-3-3 v regulaci G-proteinové signalizace: vazba na protein RGS

Jak bylo zmíněno výše, proteiny RGS se jednak skrze RGS doménu váží na $G\alpha$ podjednotku heterotrimerního G proteinu a jednak interagují s dalšími molekulami. Důležitou roli hraje vazba na regulační proteiny 14-3-3.

Tato interakce byla poprvé popsána v roce 2000 a konkrétně se jednalo o fosforylované proteiny RGS7 a RGS3. Jako hlavní vazebný motiv byla u proteinu RGS7 identifikována oblast fosforylovaného serinu na pozici 434 (číslování odpovídá lidskému proteinu RGS7) (Benzing et al., 2000). Tento serin je součástí vysoce konzervovaného SYP motivu na C konci RGS domény. Vyřešená krystalová struktura signálního komplexu $G\alpha_{i,1}$ /RGS4 ukazuje, že tento serin se přímo účastní vazby proteinu RGS na $G\alpha$ podjednotku G proteinu (Tesmer et al., 1997).

V roce 2002 byla potvrzena interakce proteinů RGS3, RGS7 s proteinem 14-3-3. Navíc bylo zjištěno, že ve chvíli, kdy dojde k fosforylaci proteinů RGS a jejich vazbě na protein 14-3-3, je blokována interakce mezi proteinem RGS a $G\alpha$ podjednotkou G proteinu (*viz. Obr. 2.7*). U proteinu RGS3 překvapivě nebyla identifikována žádná interakce s proteinem 14-3-3 v rámci RGS domény, ale jako hlavní vazebný motiv byla popsána oblast fosforylovaného serinu na pozici 264 na N konci molekuly (číslování odpovídá lidskému proteinu RGS3). Mutace serinu na pozici 264 na alanin vyústila ve ztrátu schopnosti vazby RGS3 na 14-3-3, zatímco schopnost vazby na $G\alpha$ byla zachována (Niu et al., 2002; Ward and Milligan, 2005).

V roce 2006 byly jako další vazební partneři proteinů 14-3-3 identifikovány proteiny RGS4, RGS5 a RGS16. Tato interakce je podle autorů nezávislá na fosforylaci (Abramow-Newerly et al., 2006). Posledním prozatím objeveným interakčním partnerem proteinů 14-3-3 z rodiny RGS je RGS18. Zde autoři identifikovali dvě vazebná místa, jednak oblast okolo fosforylovaného serinu 49 a dále pak oblast okolo fosforylovaného serinu 218 (číslování odpovídá lidskému proteinu RGS18). Protein 14-3-3 tedy interaguje jak s N terminální částí molekuly RGS18, tak i s RGS doménou (Gegenbauer et al., 2012).



Obr. 2.7: Navázáním hormonu či neurotransmiteru na receptor spojený s G proteinem dojde k aktivaci G proteinu (uvolnění GDP z $G\alpha$ podjednotky a jeho výměna za GTP + disociace $G\beta\gamma$ podjednotky). $G\alpha$ -GTP i $G\beta\gamma$ podjednotky mohou aktivovat efektor (nahore). V přítomnosti RGS (uprostřed) však dojde k navázání tohoto proteinu na aktivovanou $G\alpha$ -GTP podjednotku, což způsobí urychlení hydrolyzy GTP. Proteiny RGS jsou tedy limitující pro životnost $G\alpha$ -GTP a ukončují přenos signálu. Protein RGS je sám regulován fosforylací a vazbou proteinu 14-3-3 (dole). Vazba proteinu 14-3-3 blokuje interakci mezi proteinem RGS a $G\alpha$ podjednotkou G proteinu (kresleno podle (Ishii and Kurachi, 2003)).

Snížení GTPasové aktivity proteinu RGS7 v přítomnosti proteinu 14-3-3, by se dalo vysvětlit kompeticí mezi proteinem 14-3-3 a $G\alpha$ podjednotkou, neboť vazebné místo je pro oba proteiny shodné – oblast okolo serinu 434 z konzervovaného SYP motivu na C konci RGS domény. Stejně tak však bylo pozorováno snížení GTPasové aktivity v přítomnosti 14-3-3 u proteinu RGS3. V tomto případě se vazebná místa liší. Vazebné místo pro $G\alpha$ podjednotku se nachází v rámci RGS domény a jako hlavní vazebný motiv RGS3 pro protein 14-3-3 byla identifikována oblast v okolí fosforylovaného serinu 264 na N konci molekuly. Jak tedy vysvětlit, že vazba proteinu 14-3-3 na N konec molekuly RGS blokuje interakci mezi RGS doménou, která se nachází na C konci molekuly RGS a $G\alpha$ podjednotkou? Pomocí tryptofanové fluorescence bylo ukázáno, že protein 14-3-3 ovlivňuje strukturu nejen N terminální části molekuly proteinu RGS3, kde se nachází hlavní vazebný motiv, ale také ovlivňuje strukturu RGS domény, a navíc že samotná RGS doména je do určité míry schopna interagovat s proteinem 14-3-3 (Rezabkova et al., 2010). Následně byl na základě dat z metod: malouhlový rozptyl rentgenového záření, H/D výměna spojená s hmotnostní spektrometrií a měření vzdáleností technikou Försterova rezonančního přenosu energie navržen model komplexu RGS3/14-3-3. Tento model ukazuje, že RGS doména proteinu RGS3 interaguje s málo konzervovanou oblastí proteinu 14-3-3 nacházející se mimo centrální kanál. Tato struktura společně s daty z časově-rozlišené fluorescence vysvětlují mechanismus jakým vazba proteinu 14-3-3 na protein RGS3 blokuje interakci mezi proteinem RGS3 a $G\alpha$ podjednotkou. Vazba proteinu 14-3-3 jednak tuto interakci stericky blokuje a navíc způsobuje signifikantní konformační změnu RGS domény v okolí cysteinu 456, který je součástí interakčního povrchu s $G\alpha$ podjednotkou (Rezabkova et al., 2011).

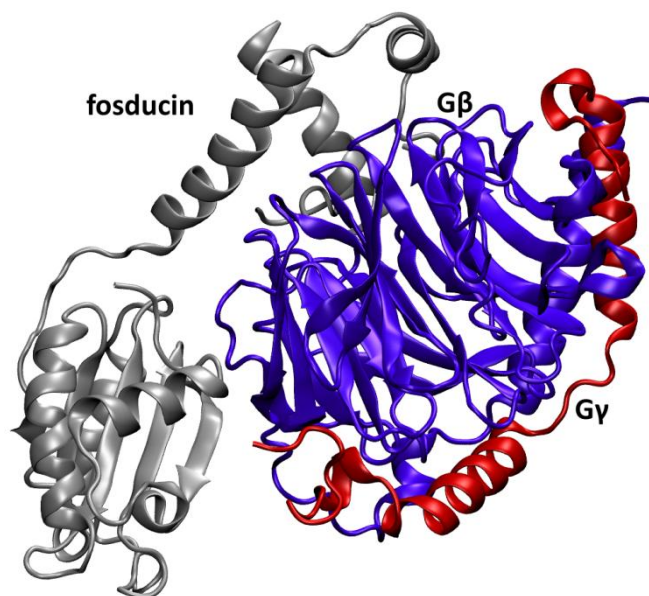
2.3 Fosducin

Adekvátní regulace G-proteinové signalizace je nesmírně důležitá pro správný průběh mnoha dějů v buňce. V předchozí kapitole byla zmíněna negativní regulace pomocí vazby proteinu RGS, který se váže na aktivovanou $G\alpha$ -GTP podjednotku heterotrimerního G proteinu a pomocí stabilizace transientního stavu urychluje hydrolýzu GTP. Dalším způsobem regulace G-proteinové dráhy na úrovni G proteinu je vazba fosducinu na $G\beta\gamma$ podjednotku. Tato vazba následně brání opětovnému spojení $G\beta\gamma$ s $G\alpha$, jde tedy opět o negativní regulaci, kde dochází k přerušení přenosu signálu pomocí G-proteinové signální dráhy (Bauer et al., 1992; Lee et al., 1987).

Fosducin byl poprvé objeven v retině jako fosfoprotein. Vyskytuje se ve velkých koncentracích v savčích fotoreceptorových buňkách sítnice a vývojově příbuzné mozkové šišinky, v menších koncentracích pak i v dalších tkáních (Danner and Lohse, 1996; Lee et al., 1990b; Lee et al., 1987). Nejlépe je popsána jeho úloha v biochemii vidění (Bauer et al., 1992; Lee et al., 1987). Navíc hraje roli v regulaci krevního tlaku (Beetz and Hein, 2011) a v kontrole transkripce (Zhu and Craft, 2000a, b).

2.3.1 Struktura fosducinu a jeho vazba na $G\beta\gamma$ podjednotku G proteinu

Jak ukázala vyřešená krystalová struktura fosducinu v komplexu s $G\beta\gamma$ podjednotkou transducinu ($G_i\beta\gamma$), fosducin se skládá ze dvou domén, které jsou otočeny kolem $G_i\beta\gamma$ a navzájem spolu neinteragují (*viz. Obr. 2.8*) (Gaudet et al., 1996; Loew et al., 1998). N terminální doména se váže na část $G_i\beta$ podjednotky, která je odpovědná za interakci s $G_i\alpha$ a stericky brání opětovnému spojení $G_i\beta\gamma$ s $G_i\alpha$. C terminální doména vykazuje strukturní homologii k thioredoxinu a interaguje s částí $G_i\beta\gamma$, která odpovídá za vazbu na membránu. Přestože N terminální doména fosducinu v komplexu s $G_i\beta\gamma$ podjednotkou vykazuje určitou strukturovanost (je částečně α -helikální), NMR a CD spektroskopické studie ukázaly, že ve volném, na $G_i\beta\gamma$ podjednotku nenavázaném, fosducinu je N terminální doména vysoce nestrukturovaná (Gaudet et al., 1999).



Obr. 2.8: Struktura fosducinu v komplexu s $G_i\beta\gamma$ (PDB kód: 1A0R) (Gaudet et al., 1996).

2.3.2 Úloha fosducinu v biochemii vidění: vliv fosforylace a vazby proteinu 14-3-3

Jedna z nejlépe charakterizovaných G-proteinových signálních drah je dráha odpovědná za přenos světelného signálu přes membránu a jeho přeměnu v neurální odpověď. V této dráze foton zachycený fotoreceptorem rodopsinem způsobí fotoizomeraci 11-*cis*-retinalu na *all-trans*-isomer. Konformační změna způsobená touto izomerací aktivuje rodopsin, který následně aktivuje G protein transducin ($G_t\alpha\beta\gamma$) tím, že indukuje výměnu GTP za GDP. Aktivovaná $G_t\alpha$ -GTP podjednotka transducinu disociuje od $G_t\beta\gamma$ a aktivuje cGMP fosfodiesterasu. Výsledkem je snížení koncentrace cGMP, které následně způsobí zavření cGMP uzavíratelných kationových kanálů, což vede ke snížení koncentrace vápenatých iontů v cytoplasmě a k hyperpolarizaci plasmatické membrány fotoreceptorových buněk.

V buňkách tyčinek adaptovaných na tmu stačí jeden foton na aktivaci jedné molekuly rodopsinu, což vede k degradaci 100 000 molekul cGMP a to je dostatečné množství k vyvolání nervového impulsu. Za plného světla by ovšem takováto úroveň amplifikace byla příliš silná. Musí tedy existovat mechanismy, jež vedou ke snížení citlivosti fotoreceptorů na světlo (adaptaci na světlo). Adaptace může být buď okamžitá, nebo dlouhodobá. Rodopsinkinasa a arrestin, které jsou schopny inaktivovat rodopsin, jsou součástí okamžité regulace. Fosducin byl navržen jako kandidát dlouhodobé adaptace na světlo (Hargrave and McDowell, 1992; Lolley and Lee, 1990; Wilkins et al., 1996). Fosducin se vyskytuje ve velkých koncentracích v savčích fotoreceptorových buňkách sítnice, kde se množství fosducinu rovná množství transducinu (Lee et al., 1990c; Wilkins et al., 1996). V tyčinkách adaptovaných na světlo se fosducin váže s vysokou afinitou na $G_t\beta\gamma$ komplex, čímž se zabrání opětovnému spojení $G_t\beta\gamma$ s $G_t\alpha$ a dojde tedy k redukci amplifikace signálu na úrovni G proteinů.

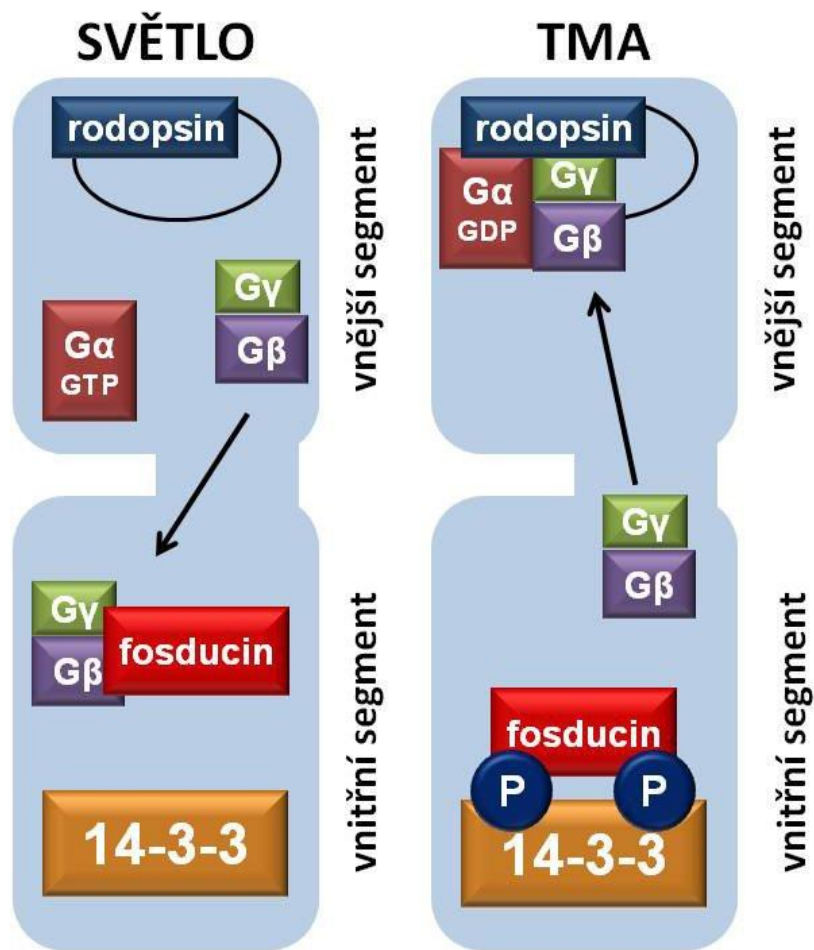
V tyčinkách existuje korelace mezi fosforylací fosducinu a stupněm adaptace na světlo. Za tmy se fosducin nachází ve své fosforylované formě a k defosforylaci dochází jako odpověď na světlo (Lee et al., 1984). Za světla se defosforylovaný fosducin váže na $G_t\beta\gamma$ a blokuje opětovné spojení $G_t\beta\gamma$ s $G_t\alpha$. Doba, ve které zůstává fosducin vázán na $G_t\beta\gamma$ je doba, kdy jsou tyčinky adaptovány na světlo a tato adaptace trvá až do okamžiku, kdy dojde k fosforylaci fosducinu.

Za světla dochází pomocí mechanismů popsaných výše k uzavření cGMP uzavíratelných kationových kanálů, což způsobí snížení koncentrace vápenatých iontů v cytoplasmě, následně je snížena aktivita adenyl cyclasy, a to dále vede ke snížení produkce cAMP. Tím-

to mechanismem je deaktivována PKA a dojde ke zvýšení koncentrace nefosforylovaného fosducinu, který se silně váže na $G_i\beta\gamma$. Za tmy vzroste koncentrace cGMP a cAMP, tudíž vzroste i úroveň fosforylace fosducinu, který se ve své fosforylované formě na $G_i\beta\gamma$ komplex neváže a amplifikace signálu je tedy maximální (Willardson et al., 1996).

Bylo ukázáno, že PKA je schopná fosforylovat fosducin na serinovém zbytku 73 a Ca^{2+} /kalsmodulin dependentní kinasa II (CaMKII) fosforyluje serinové zbytky 6, 36, 54, 73 a 106 (číslování odpovídá lidskému fosducinu) (Lee et al., 1990a; Thulin et al., 2001). Nicméně fosforylace pouze serinových zbytků 54 a 73 je dostačující k přerušení interakce mezi $G_i\beta\gamma$ komplexem a fosducinem. Tyto výsledky však odporovaly studiím *in vitro*, kdy spolu tyto dva proteiny i přes fosforylaci obou serinů interagovaly. Vysvětlení tohoto rozporu přinesl objev, že fosducin fosforylovaný na serinovém zbytku 54 a 73 interaguje s proteinem 14-3-3. Vazba proteinu 14-3-3 blokuje interakci mezi fosducinem a $G_i\beta\gamma$ (Nakano et al., 2001; Thulin et al., 2001). Mechanismus, jakým protein 14-3-3 blokuje vazbu fosducinu na $G_i\beta\gamma$ byl vysvětlen pomocí rozličných fluorescenčních měření. Tato měření ukázala, že vazba proteinu 14-3-3 ovlivní strukturu jak N terminální domény, kde se nacházejí serinové zbytky 54 a 73, tak i C terminální domény fosforylovaného fosducinu, což naznačuje, že vazba proteinu 14-3-3 indukuje v obou doménách fosducinu značné konformační změny. Vazba proteinu 14-3-3 na fosducin tedy stericky blokuje interakci mezi fosducinem a $G_i\beta\gamma$ a navíc způsobuje značné konformační změny v oblastech fosducinu, které jsou důležité pro vazbu na $G_i\beta\gamma$ podjednotku transducinu (Rezabkova et al., 2012).

Fosducin jednak stericky blokuje opětovné spojení $G_i\beta\gamma$ s $G_i\alpha$ a jednak hraje důležitou roli v translokaci $G_i\beta\gamma$ z vnějšího do vnitřního segmentu tyčinek (*viz. Obr. 2.9*). Pokud je $G_i\beta\gamma$ spojená s $G_i\alpha$ v heterotrimer, tak je navázána na diskové membrány vnějšího segmentu tyčinek. Za světla se na $G_i\beta\gamma$, která se odpojila od $G_i\alpha$ a diskové membrány, váže nefosforylovaný fosducin, který iniciuje translokaci $G_i\beta\gamma$ do všech částí fotoreceptorové buňky a brání jejímu opětovnému spojení s $G_i\alpha$. Za tmy dojde ve vnitřním segmentu k fosforylaci fosducinu a jeho vazbě na protein 14-3-3. Vazba proteinu 14-3-3 blokuje interakci mezi fosducinem a $G_i\beta\gamma$. Volná $G_i\beta\gamma$ podjednotka se spojí s $G_i\alpha$, přesouvá se zpět do vnějšího segmentu a napojí se na diskovou membránu (Lee et al., 2004).



Obr. 2.9: Za světla (vlevo) se na $G_{\beta\gamma}$, která se odpojila od G_{α} a diskové membrány, váže nefosforylovaný fosducin, který iniciuje translokaci $G_{\beta\gamma}$ do všech částí fotoreceptorové buňky a brání jejímu opětovnému spojení s G_{α} . Za tmy (vpravo) dojde ve vnitřním segmentu k fosforylaci fosducinu a jeho vazbě na protein 14-3-3. Vazba proteinu 14-3-3 blokuje interakci mezi fosducinem a $G_{\beta\gamma}$. Volná $G_{\beta\gamma}$ podjednotka se spojí s G_{α} , přesouvá se zpět do vnějšího segmentu, kde se napojí se na diskovou membránu (kresleno podle (Lee et al., 2004)).

2.3.3 Další funkce fosducinu

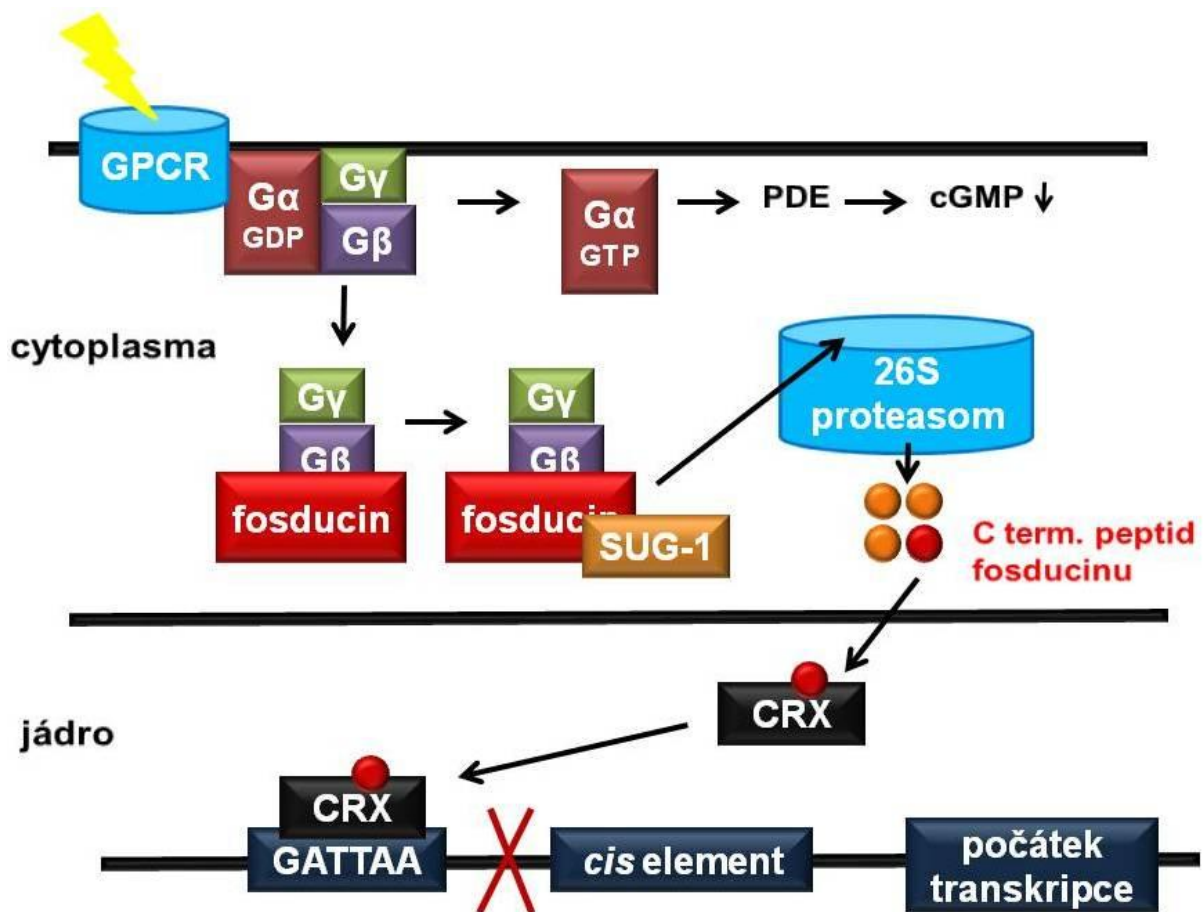
Funkce negativního regulátoru G-proteinové signalizace v procesu vidění je u fosducinu známá dlouho a je extenzivně studována. Což ale neznamená, že by se neúčastnil dalších dějů v buňce. Byly popsány další dva interakční partneři fosducinu: podjednotka 26S proteasomu – protein SUG-1 (Zhu and Craft, 1998) a transkripční faktor CRX, který je specifický pro šišinku a retinu (Zhu and Craft, 2000b).

CRX je člen Otd/Otx homeoboxové genové rodiny, kódující transkripční faktory, které jsou důležité pro vývoj přední části hlavy a smyslových orgánů (Furukawa et al., 1997; Chen et al., 1997). V retině se CRX váže na konservovaný motiv TAATCC/A před promotorovou oblast několika genů specifických pro fotoreceptory: opsin, protein vázající retinoidy (IRBP), β -fosfodiesterasu a arrestin (Furukawa et al., 1997). V šišince se CRX váže na transaktivační element TAATC/T před promotorovou oblast genů pro: ATPasu, která je specifická pro šišinku a ostatní geny kódující enzymy důležité pro syntézu melatoninu: N-acetyl transferasu a hydroxyindole-O-methyltransferasu (Li et al., 1998). CRX interaguje s C terminální částí fosducinu (Zhu and Craft, 2000b) a vazba fosducinu na CRX neblokuje vazbu CRX na DNA a ani není blokována vazba fosducinu na $G_i\beta\gamma$ (Zhu and Craft, 2000b).

Interakce proteinu SUG-1 s fosducinem směřuje fosducin do 26S proteasomu a vede k degradaci fosducinu na peptidy. Vazba proteinu SUG-1 na fosducin, stejně jako v případě CRX, nebrání vazbě fosducinu na $G_i\beta\gamma$. Vazebná místa na fosducinu pro SUG-1 a CRX se překrývají, ale pro vazbu proteinu SUG-1 je navíc třeba i dalších interakcí s N terminální částí fosducinu. Interakce fosducinu s proteinem SUG-1 je mnohem silnější než s proteinem CRX (Zhu and Craft, 1998).

Byl navržen model funkce proteinů SUG-1 a fosducinu v regulaci funkce proteinu CRX (viz. Obr. 2.10). SUG-1 se váže na volný fosducin nebo fosducin vázaný na $G_i\beta\gamma$ a směřuje ho do 26S proteasomu, kde je degradován na peptidy. Peptid, který obsahuje C terminální konec fosducinu se může v jádře navázat na protein CRX. CRX navázaný na C terminální část fosducinu je stále schopen vázat DNA, ale je blokována aktivace genů, která je normálně řízena právě vazbou transkripčního faktoru CRX (Zhu and Craft, 2000b).

Z dalších funkcí fosducinu se v současné době diskutuje jeho možná role v regulaci vysokého krevního tlaku. Fosducin ovlivňuje sympatetický nervový systém a při jeho dysfunkci dochází ke zvýšení krevního tlaku u myši i u lidí. Molekulární mechanismus vlivu fosducinu na krevní tlak je zatím neznámý a je třeba dalších studií, aby se ukázalo, zda by fosducin nebyl vhodným cílem léků na vysoký krevní tlak (Beetz et al., 2009; Beetz and Hein, 2011).



Obr. 2.10: *SUG-1 se váže na volný fosducin nebo fosducin vázaný na $G_{i\beta\gamma}$ a směřuje ho do 26S proteasomu, kde je degradován na peptidy. Peptid, který obsahuje C terminální konec fosducinu se může v jádře navázat na protein CRX. CRX navázaný na C terminální část fosducinu je stále schopen vázat DNA, ale je blokována aktivace genů, která je normálně řízena právě vazbou transkripčního faktoru CRX (kresleno podle (Zhu and Craft, 2000b)).*

3. Cíle práce

Hlavním cílem této disertační práce bylo studium úlohy proteinů 14-3-3 v regulaci G-proteinové signální dráhy. Snažila jsem se pochopit strukturní podstatu mechanismu, kterým fosforylace a vazba proteinu 14-3-3 reguluje biologickou aktivitu a funkci proteinů RGS3 a fosducinu. Jako hlavních nástrojů studia bylo využito metod fluorescenční spektroskopie, analytické ultracentrifugace, malouhlového rozptylu světla a H/D výměny spojené s hmotnostní spektrometrií.

Konkrétní cíle práce byly následovné:

1. Studium strukturní podstaty regulace funkce proteinu RGS3 fosforylací a vazbou proteinu 14-3-3.

- Provést biochemickou/biofyzikální charakterizaci proteinového komplexu RGS3/14-3-3.
- Prozkoumat zda vazba proteinu 14-3-3 indukuje konformační změny proteinu RGS3 a pokud ano, tak v kterých oblastech.
- Vyřešit strukturu proteinového komplexu RGS3/14-3-3.
- Získat odpověď na otázku: Jakým způsobem inhibuje protein 14-3-3 vazbu mezi proteinem RGS3 a $G\alpha$ podjednotkou heterotrimerního G proteinu?

2. Studium strukturní podstaty regulace funkce fosducinu fosforylací a vazbou proteinu 14-3-3.

- Provést biochemickou/biofyzikální charakterizaci proteinového komplexu fosducin/14-3-3.
- Prozkoumat zda vazba proteinu 14-3-3 indukuje konformační změny fosducinu a pokud ano, tak v kterých oblastech.
- Získat odpověď na otázku: Jakým způsobem inhibuje protein 14-3-3 vazbu mezi fosducinem a $G_i\beta\gamma$ podjednotkou heterotrimerního G proteinu?

4. Materiály a metody

4.1 Exprese a purifikace proteinů

4.1.1 Protein RGS3

Gen kódující lidský protein RGS3 (aminokyselinová sekvence 229-513 a aminokyselinová sekvence 255-513) byl zaklonován do vektoru pET-15b mezi restrikční místa pro endonukleasy NdeI a BamHI jako fúzní protein s histidinovou kotvou. Pomocí cílené mutagenese (byla využita sada „Quick Change™ Site-Directed Mutagenesis kit“, Stratagene, USA) byly připraveny mutanty proteinu RGS3 (aminokyselinová sekvence 229-513), které obsahovaly pouze jeden tryptofanový zbytek (nativní protein obsahuje tři tryptofanové zbytky na pozici 295, 391 a 424) a mutanty proteinu RGS3 (aminokyselinová sekvence 255-513), které obsahovaly pouze jeden cysteinový zbytek (nativní protein obsahuje pět cysteinových zbytků na pozici 276, 285, 427, 456 a 480). Všechny mutované tryptofanové zbytky byly změněny na fenylalaninové, mutované cysteinové zbytky byly změněny buď na alaninové nebo na serinové. Výsledky cílené mutagenese byly ověřeny pomocí DNA sekvenování. Protein RGS3 a všechny jeho mutanty byly exprimovány v bakteriálním expresním systému (kmen bakterií *E.coli* BL21 (DE3)). Po indukci exprese pomocí 0,5 mM IPTG byla bakteriální kultura ponechána za konstantního třepání (200 rpm) přes noc při 25 °C. Protein RGS3 byl purifikován pomocí niklové afinitní chromatografie a následně gelové permeační chromatografie v pufru 20 mM Tris (7.5), 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,01% (w/v) NP40, 10% (w/v) glycerol, 3 mM DTT. Výsledná čistota proteinu byla zkontrolována pomocí SDS-PAGE.

4.1.2 Protein fosducin

Gen kódující krysí protein fosducin (aminokyselinová sekvence 1-246) byl zaklonován do vektoru pET-15b mezi restrikční místa pro endonukleasy NdeI a BamHI jako fúzní protein s histidinovou kotvou. Pomocí cílené mutagenese (byla využita sada „Quick Change™ Site-Directed Mutagenesis kit“, Stratagene, USA) byl nejdříve připraven mutant, kde oba serinové zbytky (na pozici 54 a 73), jejichž fosforylace je důležitá pro interakci s proteinem 14-3-3, mohou být fosforylovány pomocí PKA (glutaminový zbytek na pozici 52 byl změněn na lysinový). Tento mutant byl využit jako výchozí konstrukt pro přípravu dalších mutantů fosducinu obsahujících pouze jeden cysteinový zbytek (nativní protein obsahuje pět cysteinových zbytků na pozici 89, 97, 148, 157 a 168). Všechny mutované cysteinové zbytky

byly změněny na alaninové. Výsledky cílené mutagenese byly ověřeny pomocí DNA sekvenování. Fosducin a všechny jeho mutanty byly exprimovány v bakteriálním expresním systému (kmen bakterií *E.coli* BL21 (DE3)). Po indukci exprese pomocí 0,5 mM IPTG byla bakteriální kultura ponechána za konstantního třepání (200 rpm) přes noc při 25 °C. Protein fosducin byl purifikován pomocí niklové afinitní chromatografie, aniontově-výměnné a následné gelové permeační chromatografie v pufru 20 mM Tris (7.5), 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA, 10% (w/v) glycerol, 3 mM DTT. Výsledná čistota proteinu byla zkontrolována pomocí SDS-PAGE.

4.1.3 Protein 14-3-3

Gen kódující lidský protein 14-3-3 ζ byl taktéž zaklonován v plasmidu pET-15b mezi restrikční místa pro endonukleasy NdeI a BamHI jako fúzní protein s histidinovou kotvou. Pro měření časově-rozlišené tryptofanové fluorescenční spektroskopie byl použit mutant 14-3-3 ζ noW (noW značí, že daný protein neobsahuje žádný tryptofanový zbytek, tryptofanové zbytky na pozici 59 a 228 byly změněny na fenylalaninové). Pro studium komplexu fosducin/14-3-3 ζ byl využit konstrukt 14-3-3deltaC (deltaC značí chybějící C konec proteinu 14-3-3, na pozici 231 byl umístěn stop kodon). Pro měření Försterova rezonančního přenosu energie byl využit monomerní protein 14-3-3 (serinový zbytek na pozici 58 byl mutován na asparátový) obsahující pouze jeden cysteinový zbytek (nativní protein obsahuje dva cysteinové zbytky na pozici 25 a 186). Protein 14-3-3 a všechny jeho mutanty byly exprimovány v bakteriálním expresním systému (kmen bakterií *E.coli* BL21 (DE3)). Po indukci exprese pomocí 0,5 mM IPTG byla bakteriální kultura ponechána za konstantního třepání (200 rpm) přes noc při 30 °C. Protein 14-3-3 byl purifikován pomocí niklové afinitní chromatografie, aniontově-výměnné chromatografie a následné gelové permeační chromatografie v pufru 20 mM Tris (7.5), 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA, 10% (w/v) glycerol, 5 mM DTT. Výsledná čistota proteinu byla zkontrolována pomocí SDS-PAGE.

4.2 Modifikace pomocí fluorescenčních sond

Mutanty proteinu RGS3 obsahující pouze jeden cysteinový zbytek (na pozici 276, 285, 427, 456 nebo 480) a mutanty fosducinu obsahující pouze jeden cysteinový zbytek (na pozici 89, 97, 148, 157 a 168) byly kovalentně modifikovány fluorescenční sondou 1,5-IAEDANS.

Daný protein o koncentraci 50 μM (v pufru 20 mM Tris (pH 7.5), 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA, 10% (w/v) glycerol) byl smíchán s fluorescenční sondou v molárním poměru 1:20 a inkubován 2 hod při 30 °C a následně ponechán ve 4 °C přes noc. Volná nenavázaná fluorescenční sonda byla následně odstraněna pomocí gelové permeační chromatografie.

Mutanty monomerního proteinu 14-3-3 obsahující pouze jeden cysteinový zbytek (na pozici 25 nebo 189) byly kovalentně modifikovány fluorescenční sondou 5-iodoacetamidofluorescein (5-IAF). Daný protein o koncentraci 40 μM (v pufru 50 mM Tris (pH 7.5), 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA, 10% (w/v) glycerol) byl smíchán s fluorescenční sondou v molárním poměru 1:40 a inkubován 8 hod při pokojové teplotě a následně ponechán ve 4 °C přes noc. Volná nenavázaná fluorescenční sonda byla následně odstraněna pomocí gelové permeační chromatografie. Porovnáním hodnoty absorbance proteinu (280 nm) a hodnoty absorbance navázaného 5-IAF (492 nm, extinkční koeficient $78000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bylo ověřeno 99-100% označení obou mutantů proteinu 14-3-3 fluorescenční sondou 5-IAF.

4.3 *In vitro* fosforylace

In vitro fosforylace proteinu RGS3 (a všech jeho mutantů) na serinu 264 a fosducinu (a všech jeho mutantů) na serinu 54 a 73 pomocí PKA byla provedena v pufru 20 mM Tris (pH 7.5), 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA, 3 mM DTT, 10% (w/v) glycerol. Protein byl inkubován s 100 u PKA na 1 mg proteinu (200 u v případě fosducinu) v přítomnosti 50 mM MgCl_2 a 0,75 mM ATP po dobu 2 hod ve 30 °C a následně ponechán při 4 °C přes noc. Volné nenavázané ATP bylo následně odstraněno pomocí gelové permeační chromatografie. Fosforylace byla potvrzena pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (doc. RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D.)

4.4 Analytická ultracentrifugace

Měření sedimentačních rychlostí a rovnovah bylo provedeno na analytické ultracentrifuze Proteomlab XL-I Beckman Coulter za využití rotoru AnTi50. Vzorky byly před měřením dialyzovány do pufru 20 mM Tris (pH 7.5), 0,2 M NaCl, 2 mM β -merkaptóetanol. Hustota a viskozita pufru a také parciální specifické objemy všech proteinů byly stanoveny pomocí programu SEDNTERP (<http://www.jphilo.mailway.com/download.htm>). U všech proteinů byla změřena série vzorků o různé koncentraci (rozmezí 0.5 – 60 μM) a v případě komplexů i

vzorky za různého poměru jednotlivých komponent. Data byla analyzována pomocí programů Sedfit (Schuck, 2000) a Sedphat (Schuck, 2003).

Měření sedimentačních rychlostí probíhalo při 20 °C při rychlosti 48 000 rpm za využití absorbního detekčního systému (absorbance při 280 nm a/nebo 250 nm). Sedimentační profil byl zaznamenáván každých 5 min.. Data byla fitována pomocí modelu distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$. Distribuce zahrnovala rozmezí sedimentačních koeficientů 0-10 S s rozlišením 150 a intervalem spolehlivosti 0.68. Hodnota pozorovaného sedimentačního koeficientu byla získána integrací plochy pod vrcholem distribuce. Z dat byla získána stechiometrii komplexu a zdánlivá disociační konstanta.

Měření sedimentačních rovnováh probíhalo při 4 °C a vždy při minimálně třech rychlostech v rozmezí: 8 000 - 26 000 rpm za využití absorbního detekčního systému. Absorbance data (absorbance při 280 nm a/nebo 250 nm) byla sbírána při každé rychlosti po ustavení rovnováhy a byla zaznamenána jako průměr z 20 sedimentačních profilů. V programu Sedphat byla provedena globální analýza dat, která byla naměřena při různých koncentracích proteinů, poměrech smíchání jednotlivých komponent a při několika rychlostech. Data byla fitována pomocí několika modelů: ideální, neasociující částice; rovnovážný systém $A + B \rightleftharpoons AB$ a rovnovážný systém $A + 2B \rightleftharpoons AB_2$. Pomocí statistické analýzy byl vždy vybrán ten model, kde fit nejlépe odpovídal naměřených datům. Z dat poté byla získána stechiometrii komplexu a zdánlivá disociační konstanta.

4.5 Časově-rozlišená fluorescence

Veškerá měření časově-rozlišené fluorescence bylo provedeno ve spolupráci s doc. RNDr. Petrem Heřmanem, CSc. a doc. RNDr. Jaroslavem Večeřem, CSc. z Fyzikálního Ústavu Matematicko-Fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Pro měření bylo využito fluorimetru pro časově-rozlišenou fluorescenci, který se skládal z femtosekundového Ti:safírového laseru (model Chameleon Ultra II a Pulse Picker HP), detektoru založeného na sčítání jednotlivých fotonů (single photon counting detector) a fotonásobiče (Hamamatsu, R3809U-50). Vzorky byly umístěny do termostatického držáku a všechna měření byla provedena v 22 °C v pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA a 3 mM β -merkaptotanol. Koncentrace proteinu RGS3 byla 10 μ M, koncentrace fosducinu 30 μ M a koncentrace 14-3-3 20 μ M pro měření s proteinem RGS3 a 60 μ M pro měření s fosducinem. Pro excitace vzorků byly použity následující vlnové délky: $\lambda(\text{tryptofan}) = 295 \text{ nm}$,

$\lambda(\text{AEDANS}) = 315 \text{ nm}$. Excitační spektra byla snímána pro následující emisní vlnové délky: $\lambda(\text{tryptofan}) = 355 \text{ nm}$, $\lambda(\text{AEDANS}) = 480 \text{ nm}$. Veškeré rovnice v následujícím textu byly převzaty z literatury (Lakowicz, 2006).

4.5.1 Časově-rozlišené měření dohasínání intenzity fluorescence

Dohasínání intenzity fluorescence bylo získáváno pod „magickým“ úhlem, kde měřené hodnoty intenzity dohasínání fluorescence $I(t)$ nezávisí na rotační difúzi fluoroforu a poskytuje nezkreslenou informaci o středních dobách života. Bylo předpokládáno multiexponenciální dohasínání fluorescence podle následující rovnice:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \cdot e^{-t/\tau_i} \quad (\text{rovnice 1})$$

kde τ_i jsou střední doby života a α_i jsou korespondující amplitudy. Naměřené intenzity byly analyzovány metodou maximální entropie (SVD-MEM) (Bryan, 1990). Tímto způsobem obdržíme sadu amplitud α_i , jež reprezentují distribuci doby života τ_i v i -tém dohasínání. Střední doby života byly spočítány podle následujícího vzorce:

$$\tau_{mean} = \sum_i f_i \tau_i \quad (\text{rovnice 2})$$

Frakční intenzita f_i se vypočítá podle následujícího vztahu:

$$f_i = \alpha_i \tau_i / \sum_i \alpha_i \tau_i \quad (\text{rovnice 3})$$

4.5.2 Časově-rozlišené měření dohasínání anisotropie fluorescence

Fluorescenční měření dohasínání anisotropie $r(t)$ byly obdrženy měřením dohasínání rovnoběžné $I_{\parallel}(t)$ a kolmé $I_{\perp}(t)$ komponenty. Data byla získána za stejných podmínek a analyzována obdobně jako při získávání středních dob života metodou maximální entropie (SVD-MEM). Anisotropie byly analyzovány pro sérii exponencií:

$$r(t) = \sum_i \beta_i \cdot e^{-t/\theta_i} \quad (\text{rovnice 4})$$

kde amplitudy β_i reprezentují distribuci rotačně korelačních časů θ_i . β_i souvisí s počáteční anisotropií r_0 podle následující rovnice:

$$r_0 = \sum_i \beta_i \quad (\text{rovnice 5})$$

4.5.3 Měření Försterova rezonančního přenosu energie

Försterův rezonanční přenos energie byl měřen mezi fluoroforem AEDANS, kovalentně vázaným na cysteinový zbytek proteinu RGS3, a fluorescein, kovalentně navázaným na cysteinový zbytek monomerního proteinu 14-3-3. Průměrná účinnost přenosu energie E byla spočítána ze střední doby života donoru v přítomnosti akceptoru (τ_{DA}) a v jeho nepřítomnosti (τ_D) podle rovnice:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (\text{rovnice 6})$$

Průměrná vzdálenost R páru donor-akceptor byla spočítána podle rovnice:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6} \quad (\text{rovnice 7})$$

R_0 je tzv. Försterův kritický poloměr a vyjadřuje takovou vzdálenost donoru a akceptoru, při které je účinnost přenosu 50%. Hodnota R_0 byla vypočítána pomocí rovnice:

$$R_0 = (8.8 \times 10^{23} \kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda))^{1/6} [\text{Å}] \quad (\text{rovnice 8})$$

kde κ^2 je orientační faktor, který je dán vzájemnou polohou fluoroforů a pro výpočet R_0 byla použita hodnota $\kappa^2 = 2/3$ odpovídající náhodně orientovaným dipólům akceptoru a donoru, n značí index lomu prostředí, Q_D kvantový výtěžek donoru a $J(\lambda)$ překryvový integrál. Kvantový výtěžek donoru Q_D byl spočítán relativně ke známému kvantovému výtěžku fluorescenční sondy AEDANS ve vodě. Rovnice překryvového integrálu charakterizuje překryv emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru a má tvar:

$$J(\lambda) = \frac{\int F_D(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int F_D(\lambda) d\lambda} [cm^3 \cdot M^{-1}] \quad (\text{rovnice 9})$$

kde $F_D(\lambda)$ značí emisní spektrum donoru a $\varepsilon(\lambda)$ je absorpční spektrum akceptoru. Všechna nezbytná emisní i absorpční spektra v plném rozsahu byly změřeny na fluorimetru pro měření stacionární fluorescence Perkin-Elmer LS50B a UV-VIS spektrometru.

4.6 H/D výměna spojená s hmotnostní spektrometrií

Veškerá měření H/D výměny spojené s hmotnostní spektrometrií bylo provedeno ve spolupráci s RNDr. Petrem Manem, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu AV ČR. H/D výměna proteinů RGS3, fosforylovaného RGS3, 14-3-3 ζ , RGS3 v přítomnosti 14-3-3 ζ a fosforylovaného RGS3 v přítomnosti 14-3-3 ζ byla zahájena desetinasobným zředěním vzorku v deuterovaném pufru (20 mM Tris (pD 7.1), 1 mM EDTA, 3 mM DTT, 0,2 M NaCl, 10% (w/v) glycerol). Koncentrace všech proteinů po zředění byla 2,5 μ M. Po 20 s, 1 min, 5 min, 10 min, 1 h, 3 h a 5 h, kdy probíhala výměna vodíků za deuteria, bylo odebráno 80 μ l a reakce byla ukončena přidáním 20 μ l 0.1 M HCl a rychlým zamražením v tekutém dusíku. Analýza deuterovaných vzorků byla provedena pomocí kapalinové chromatografie (1200 Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) připojené k ESI FT-ICR hmotnostnímu spektrometru (9.4 T APEX-Ultra, Bruker Daltonics, Billerica, MA). Analýza byla zahájena rychlým rozmražením vzorku a jeho štěpením na koloně pomocí proteasy trypsin. Vzniklé peptidy byly následně odsoleny pomocí peptidové MicroTrap kolonky (Michrom Bioresources, Auburn, CA) a separovány na koloně s C18 reverzní fází (1 \times 100 mm, Jupiter, Phenomenex) pomocí lineárního gradientu 10-45% roztoku B v roztoku A za 20 min. Roztok A se skládal z 2% (v/v) acetonitrilu, 0,4% (v/v) kyseliny mravenčí ve vodě. Roztok B obsahoval 95% (v/v) acetonitrilu, 5% vody (v/v), 0,4% (v/v) kyseliny mravenčí. MS/MS spektra byla prohledána programem MASCOT oproti databázi obsahující sekvence proteinů 14-3-3 ζ a RGS3 (jediná zvolená modifikace byla fosforylace na serinovém či treoninovém zbytku). Spektra částečně deuterovaných peptidů byla exportována do textového souboru pomocí programu DataAnalysis verze 4.0 (Bruker Daltonics) a centroidy izotopických obálek byly načteny pomocí programu MMass verze 3.11.0 (Strohalm et al., 2010).

4.7 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření

Měření maloúhlového rozptylu rentgenového záření bylo provedeno na synchrotronu DESY (Deutsches Elektronen Synchrotron) v Hamburku (DORIS III, X33 beamline) v Německu. Proteinový komplex RGS3/14-3-3 ζ byl měřen v rozmezí koncentrací 2-8 mg/ml v pufru 20 mM Tris (pH 7.5), 3 mM DTT, 0,2 M NaCl, 3% (w/v) glycerol, 1 mM EDTA. Při měření nebyla zaznamenána žádná radiační poškození vzorku. Rozptyl pufru byl odečten pomocí programu PRIMUS (Konarev et al., 2003). Poloměr gyrace R_g byl spočítán pomocí

Guinerova extrapolace v programu GNOM (Konarev et al., 2006), ve kterém byla také spočítána párová distanční distribuční funkce ($P(r)$ funkce) a maximální vzdálenost v rámci částice (D_{\max}). *Ab initio* modelování 3D obálky komplexu RGS3/14-3-3 ζ bylo provedeno v programu DAMMIF a DAMAVER (Franke and Svergun, 2009; Svergun, 1997).

5. Výsledky a diskuse

5.1 Vliv vazby proteinu 14-3-3 na RGS doménu Regulátoru G-proteinové signalizace (RGS3) – publikace I

Regulátory G-proteinové signalizace (proteiny RGS) specificky váží aktivovanou $G\alpha$ -GTP podjednotku heterotrimerního G proteinu a významně zvyšují její schopnost hydrolyzovat GTP (Siderovski et al., 1996). Dnes je známo více než 30 savčích členů RGS rodiny, přičemž všechny obsahují vysoce konzervovanou doménu (RGS doména), která specificky interaguje s aktivovanou formou $G\alpha$ podjednotky (Soundararajan et al., 2008; Tesmer et al., 1997). Vně RGS domény jsou jednotlivé členové RGS rodiny strukturně odlišní a mohou obsahovat další domény, které ovlivňují jejich cíl v buňce nebo vytvoření signálního komplexu, popř. obojí. Někteří členové RGS rodiny (např. RGS3, RGS4, RGS5, RGS7, RGS16, RGS18) jsou schopny interagovat s proteiny 14-3-3 (Benzing et al., 2000; Gegenbauer et al., 2012; Niu et al., 2002; Ward and Milligan, 2005). Dimerní kyselé regulační proteiny 14-3-3 jsou hojně exprimovány ve všech eukaryotických buňkách a hrají důležitou roli v buněčných procesech, jako je regulace apoptosy, buněčného cyklu, přenosu signálu či metabolických drah. Již bylo popsáno více jak 300 vazebných partnerů těchto proteinů a pro většinu interakcí je nutná fosforylace vazebného partnera (Obsil and Obsilova, 2011). Pro vazbu proteinu 14-3-3 na protein RGS3 je nezbytná fosforylace proteinu RGS3 na serinovém zbytku 264, který se nachází v N terminální části molekuly, vně RGS domény. Vazba proteinu 14-3-3 blokuje interakci mezi RGS doménou a aktivovanou $G\alpha$ -GTP podjednotkou a tím inhibuje biologickou funkci proteinů RGS (Niu et al., 2002). Mechanismus této inhibice je neznámý.

Hlavním cílem této práce bylo právě studium mechanismu jakým protein 14-3-3 inhibuje funkci proteinu RGS3. Pro detekování konformačních změn proteinu RGS3 po navázání proteinu 14-3-3 bylo využito měření časově-rozlišené tryptofanové fluorescence. Tato metoda je velice senzitivní ke změnám v mikrookolí fluoroforu (v tomto případě jde o tryptofany). Pomocí cílené mutagenese byly připraveny mutanty proteinu RGS3 obsahující pouze jeden tryptofanový zbytek buď na pozici 295 nebo na pozici 424. Tryptofanový zbytek na pozici 295 se nachází mimo RGS doménu v blízkosti již popsaného fosforylačního a vazebného místa pro protein 14-3-3 serinu 264, zatímco tryptofanový zbytek na pozici 424 je součástí RGS domény. Samotná fosforylace proteinu RGS3 na serinu 264 způsobí značné strukturní změny v oblasti okolo tryptofanového zbytku 295, ne však v oblasti okolo tryptofanového zbytku 424. Z výsledku měření časově-rozlišeného dohasínání anisotropie fluorescence je patrné, že vazba proteinu 14-3-3 ovlivňuje strukturu nejen N-terminální části proteinu RGS3 v blízkosti

fosforylačního místa, ale i strukturu RGS domény. Pokusy se samotnou RGS doménou ukázaly, že tato doména sama o sobě je schopná slabé interakce s proteinem 14-3-3. Byla vyřešena krystalová struktura RGS domény proteinu RGS3 s rozlišením 2.3 Å. Tato struktura ukázala, že protein 14-3-3 ovlivňuje strukturu RGS domény v oblasti, která je důležitá pro interakci s $G\alpha$ podjednotkou heterotrimerního G proteinu. Tento fakt by mohl vysvětlovat, proč vazba proteinu 14-3-3 na protein RGS3 blokuje interakci mezi RGS doménou a $G\alpha$ podjednotkou.

Tyto výsledky byly publikovány v časopise Journal of Structural Biology (viz. příloha č.1, stránky 69-80): Rezabkova, L., Boura, E., Herman, P., Vecer, J., Bourova, L., Sulc, M., Svoboda, P., Obsilova, V., Obsil, T. (2010) 14-3-3 protein interacts with and affects the structure of RGS domain of regulator of G protein signaling 3 (RGS3). J Struct Biol 170, 451-461.

Můj podíl na této publikaci: Podílela jsem se na klonování a přípravě jednotlivých mutantů proteinu RGS3. Provedla jsem expresi a purifikaci proteinu RGS3 (včetně všech jeho mutantů) a následnou *in vitro* fosforylaci. Provedla jsem expresi a purifikaci proteinu 14-3-3 (včetně všech jeho mutantů). Provedla jsem všechna měření stacionární fluorescence. Provedla jsem přípravu vzorků pro měření časově-rozlišené tryptofanové fluorescence, samotné měření bylo provedeno ve spolupráci s doc. RNDr. Petrem Heřmanem, CSc. a doc. RNDr. Jaroslavem Večeřem, CSc. z Fyzikálního Ústavu Matematicko-Fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

5.2 Struktura komplexu RGS3/14-3-3: Proč vazba proteinu 14-3-3 inhibuje funkci regulátoru G-proteinové signalizace 3 (RGS3)? – publikace II

Přenos signálu přes G-proteinovou dráhu je ovlivněn mnoha faktory. Jedním z nich je interakce regulátorů G-proteinové signalizace (proteiny RGS) s aktivovanou $G\alpha$ -GTP podjednotkou heterotrimerního G proteinu, kdy proteiny RGS významně zvyšují schopnost $G\alpha$ -GTP podjednotky hydrolyzovat GTP (Soundararajan et al., 2008; Tesmer et al., 1997). Proteiny RGS tedy fungují jako negativní regulátory G-proteinové dráhy. Nicméně jejich funkce je dále ovlivňována fosforylací a vazbou proteinů 14-3-3 (Gegenbauer et al., 2012; Niu et al., 2002; Ward and Milligan, 2005).

Proteiny 14-3-3 jsou dimerní, vysoce konzervované proteiny, které se podílejí na regulaci značného množství biologicky významných dějů. Dimer proteinu 14-3-3 má tvar písmene U a vytváří značně nabitý centrální kanál, který obsahuje dvě vazebná místa pro své partnery. Oblasti, které jsou vysoce konzervované u všech isoform proteinu 14-3-3, se nacházejí především v oblasti tohoto kanálu, méně konzervované aminokyseliny pak na vnější straně dimeru. Přes vysokou konzervaci aminokyselinových zbytků v oblasti centrálního kanálu, kterou sdílí všechny isoformy proteinu 14-3-3, vykazuje velké množství vazebných partnerů značnou specifitu ve výběru isoformy, na kterou se váží. Struktura samotného proteinu 14-3-3, případně proteinu 14-3-3 v komplexu s krátkými peptidy, je velice dobře známá, bohužel stále ještě chybí struktury, kde by byl protein 14-3-3 v komplexu s celým vazebným partnerem. Právě tyto struktury jsou klíčové pro pochopení mechanismů, kterými proteiny 14-3-3 regulují takové množství naprosto rozličných biologických procesů (Obsil and Obsilova, 2011).

Hlavním cílem této práce bylo vyřešení struktury komplexu RGS3/14-3-3 ζ a na jejím základě vysvětlení mechanismu, jakým protein 14-3-3 inhibuje funkci proteinu RGS3. Pro interakci mezi proteiny RGS3 a 14-3-3 je nutná fosforylace proteinu RGS3 na serinovém zbytku 264, který se nachází v N terminální části molekuly, vně RGS domény. Předchozí studie ukázaly, že vazba proteinu 14-3-3 ovlivňuje strukturu nejen N terminální části proteinu RGS3 v blízkosti fosforylačního místa, ale i strukturu RGS domény a navíc, že tato doména sama o sobě je schopná slabé interakce s proteinem 14-3-3 (Rezabkova et al., 2010).

V této práci podáváme strukturní vysvětlení mechanismu, jakým protein 14-3-3 inhibuje interakci mezi proteinem RGS3 a $G\alpha$ -GTP podjednotkou heterotrimerního G-proteinu. Na základě dat z metod: H/D výměna spojená s hmotnostní spektrometrií, maloúhlový rozptyl

světla a měření vzdáleností pomocí Försterova rezonančního přenosu energie byl navržen 3D model komplexu RGS3/14-3-3, který ukazuje, že RGS doména proteinu RGS3 interaguje s málo konzervovanou oblastí proteinu 14-3-3 nacházející se mimo centrální kanál. Tato struktura společně s daty z časově-rozlišené fluorescence vysvětlují mechanismus jakým vazba proteinu 14-3-3 na protein RGS3 blokuje interakci mezi proteinem RGS3 a $G\alpha$ podjednotkou. Vazba proteinu 14-3-3 jednak tuto interakci stericky blokuje a navíc způsobuje významnou konformační změnu RGS domény v okolí cysteinu 456, který je součástí interakčního povrchu s $G\alpha$ podjednotkou. Navíc interakce RGS domény s málo konzervovanou oblastí proteinu 14-3-3 na vnější straně dimeru je prvním strukturálním důkazem, že vazební partneri proteinu 14-3-3 interagují nejen s centrálním kanálem ale i s ostatními částmi proteinu 14-3-3. To může vysvětlovat specifitu, kterou vazební partneri vykazují ve výběru isoformy proteinu 14-3-3, na kterou se váží.

Tyto výsledky byly publikovány v časopise Journal of Biological Chemistry (viz. příloha č. 2, stránky 81-97): Rezabkova, L., Man, P., Novak, P., Herman, P., Vecer, J., Obsilova, V., Obsil, T. (2011) Structural basis for the 14-3-3 protein-dependent inhibition of the regulator of G protein signaling 3 (RGS3) function. J Biol Chem 286, 43527-43536.

Můj podíl na této publikaci: Připravila jsem jednotlivé mutanty proteinu RGS3. Provedla jsem expresi a purifikaci proteinu RGS3 (včetně všech jeho mutantů) a následnou *in vitro* fosforylaci, příp. modifikaci pomocí fluorescenční sondy 1,5-IAEDANS. Provedla jsem expresi a purifikaci proteinu 14-3-3 (včetně všech jeho mutantů) a příp. modifikaci pomocí fluorescenční sondy 5-IAF. Provedla jsem všechna měření sedimentačních rychlostí a sedimentačních rovnováh a následnou analýzu a interpretaci naměřených dat. Provedla jsem měření malouhlového rozptylu světla na synchrotronu v Hamburku a následnou analýzu a interpretaci naměřených dat. V laboratoři RNDr. Petra Mana, Ph.D jsem se za jeho pomoci podílela na měření H/D výměny spojené s hmotnostní spektrometrií a následné analýze a interpretaci naměřených dat. Provedla jsem přípravu vzorků pro měření Försterova rezonančního přenosu energie a časově-rozlišené dansylové fluorescence, samotné měření bylo provedeno ve spolupráci s doc. RNDr. Petrem Heřmanem, CSc. a doc. RNDr. Jaroslavem Večeřem, CSc. z Fyzikálního Ústavu Matematicko-Fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

5.3 Strukturní změny fosducinu způsobené fosforylací a vazbou proteinu 14-3-3 - publikace III

Fosducin je cytosolický fosfoprotein, který byl poprvé objeven v retině. Nachází se ve velkých koncentracích v savčích fotoreceptorových buňkách sítnice a vývojově příbuzné mozkové šišinky, v menších koncentracích pak i v dalších tkáních (Danner and Lohse, 1996; Lee et al., 1987). Fosducin hraje důležitou roli v negativní regulaci G-proteinové signalizace, neboť váže $G_i\beta\gamma$ podjednotku heterotrimerního G proteinu a brání tak jejímu opětovnému spojení s $G_i\alpha$ podjednotkou (Bauer et al., 1992). Fosducin a jeho úloha v biochemii vidění je známa poměrně dlouho, ukazuje se však, že tento protein také hraje důležitou roli v procesech jako je regulace krevního tlaku či kontrola transkripce (Beetz et al., 2009; Zhu and Craft, 2000b).

Krystalová strukturu fosducinu v komplexu s $G_i\beta\gamma$ podjednotkou transducinu ukázala, že se fosducin skládá ze dvou domén (Gaudet et al., 1996): N terminální domény, která se váže na část $G_i\beta$ podjednotky, která je odpovědná za interakci s $G_i\alpha$ a C terminální domény, která vykazuje strukturní homologii k thio-redoxinu a interaguje s částí $G_i\beta\gamma$, která odpovídá za vazbu na membránu. V této struktuře jsou obě domény obtočeny kolem $G_i\beta\gamma$ a vzájemně spolu neinteragují. Přestože N terminální doména fosducinu v komplexu s $G_i\beta\gamma$ podjednotkou vykazuje určitou strukturovanost (je částečně α -helikální), NMR a CD spektroskopické studie ukázaly, že ve volném, na $G_i\beta\gamma$ podjednotku nenavázaném, fosducinu je N terminální doména vysoce nestrukturovaná. Schopnost fosducinu vázat $G_i\beta\gamma$ podjednotku je značně ovlivněna stupněm fosforylace. Nefosforylovaný fosducin váže $G_i\beta\gamma$ velmi silně, zatímco fosforylace serinových zbytků na N konci tuto vazbu negativně ovlivňuje. *In vitro* experimenty ukázaly, že Ser73 může být fosforylován pomocí PKA a CAMKII je schopná fosforylovat serinové zbytky na pozicích 6, 36, 54, 73 a 106 (Lee et al., 1990a; Thulin et al., 2001). Nicméně, pro inhibici interakce mezi fosducinem a $G_i\beta\gamma$ *in vivo* stačí, aby byl fosducin fosforylován pouze na serinových zbytcích 54 a 73. Takto fosforylovaný fosducin interaguje s proteiny 14-3-3 (Nakano et al., 2001). Proteiny 14-3-3 jsou dimerní, vysoce konzervované regulační proteiny, které se hojně exprimují ve všech eukaryotických organismech. Skrze vazbu na více jak 300 rozličných proteinů regulují značné množství biologických významných dějů, např. apoptosu, buněčný cyklus, přenos signálu či metabolické dráhy (Obsil and Obsilova, 2011). I v případě fosducinu hrají tyto proteiny důležitou roli, neboť jejich vazba na fosducin blokuje interakci mezi fosducinem a $G_i\beta\gamma$ podjednotkou heterotrimerního G proteinu (Nakano et al., 2001).

Hlavním cílem této práce bylo pochopení mechanismu jakým proteiny 14-3-3 regulují funkci fosducinu. Pomocí metody časově-rozlišené fluorescenční spektroskopie byly studovány konformační změny fosducinu způsobené fosforylací a vazbou proteinu 14-3-3. Pro základní biofyzikální charakterizaci komplexu fosducin/14-3-3 bylo využito analytické ultracentrifugace.

Sedimentační analýza ukázala, že fosducin je v roztoku monomerní a s proteinem 14-3-3 vytváří komplex o stechiometrii 1:2 (dimer proteinu 14-3-3 váže jednu molekulu fosducinu). Měření časově-rozlišené tryptofanové a dansylové fluorescence ukázala, že fosforylace serinových zbytků 54 a 73 sama o sobě způsobuje značné konformační změny nejen v N terminální doméně, kde se daná fosforylační místa nacházejí, ale překvapivě také v C terminální doméně. Je tedy pravděpodobné, že u volného, na $G_t\beta\gamma$ nenavázaného, fosducinu (na rozdíl od fosducinu vázaného na $G_t\beta\gamma$) spolu obě domény interagují. Vazba proteinu 14-3-3 ovlivní strukturu jak N terminální, tak i C terminální domény fosforylovaného fosducinu, což naznačuje, že vazba proteinu 14-3-3 indukuje v obou doménách fosducinu značné konformační změny. K těmto změnám dochází i v oblastech, kam se váže $G_t\beta\gamma$ podjednotka. Tyto výsledky nám umožňují nahlédnout do mechanismu, jakým proteiny 14-3-3 regulují funkci fosducinu. Vazba proteinu 14-3-3 na fosducin stericky blokuje interakci mezi fosducinem a $G_t\beta\gamma$ a navíc způsobuje značné konformační změny v oblastech fosducinu, které jsou důležité pro vazbu na $G_t\beta\gamma$.

Tyto výsledky byly publikovány v časopise *Biophysical Journal* (viz. příloha č. 3, stránky 98-120): Rezabkova, L., Kacirova, M., Sulc, M., Herman, P., Vecer, J., Stepanek, M., Obsilova, V., Obsil, T. (2012) Structural modulation of phosphducin by phosphorylation and the 14-3-3 protein binding, *Biophys. J.*, přijato k otištění

Můj podíl na této publikaci: Podílela jsem se na přípravě jednotlivých mutantů fosducinu. Provedla jsem expresi a purifikaci fosducinu (včetně všech jeho mutantů) a následnou *in vitro* fosforylací, příp. modifikaci pomocí fluorescenční sondy 1,5-IAEDANS. Provedla jsem expresi a purifikaci proteinu 14-3-3 (včetně všech jeho mutantů). Provedla jsem všechna měření sedimentačních rychlostí a sedimentačních rovnováh a následnou analýzu a interpretaci naměřených dat. Provedla jsem přípravu vzorků pro měření časově-rozlišené dansylové a tryptofanové fluorescence, samotné měření bylo provedeno ve spolupráci s doc. RNDr. Petrem Heř-

manem, CSc. a doc. RNDr. Jaroslavem Večeřem, CSc. z Fyzikálního Ústavu Matematicko-Fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

5.4 Studium funkce a vlastností C terminálního segmentu kvasničných isoform proteinu 14-3-3 (BMH1 a BMH2) - publikace IV

Proteiny 14-3-3 jsou středem zájmu mnoha vědeckých skupin především díky rozmanitosti biologických dějů, kterých se účastní. Hrají důležitou roli v buněčných procesech, jako je regulace apoptosy, buněčného cyklu, přenosu signálu, metabolických drah, diferenciaci a proliferace buňky, transkripce, podílejí se na intracelulárním transportu, buněčné adhesi, či ovlivňují strukturu cytoskeletu. Jde o dimerní, vysoce konzervované regulační proteiny, které se hojně exprimují ve všech eukaryotických organismech. Zatímco u kvasinek byly popsány pouze dvě isoformy (BMH1, BMH2), u savců jich bylo identifikováno nejméně 7 (β , γ , ϵ , σ , ζ , τ , η) a u rostlin alespoň 15 (Obsil and Obsilova, 2011).

Všechny isoformy proteinu 14-3-3 jsou vysoce sekvenčně konzervované a značně rigidní, výjimkou je C terminální konec molekuly, který je značně variabilní a vysoce flexibilní. U savčích isoform má tato flexibilní oblast proteinu 14-3-3 velký význam. Byla navržena teorie, která předpokládá, že C terminální konec hraje úlohu jakéhosi autoinhibitoru vstupu nescifického ligandu do vazebného kanálu. Před navázáním ligandu se C terminálního segment nachází uvnitř vazebného kanálu a vazba ligandu způsobí jeho „vymrštění“ ven (Silhan et al., 2004). C terminální konec kvasničných isoform proteinu 14-3-3, BMH1 a BMH2, se od těch savčích liší. Jejich C terminální segment je delší a obsahuje polyglutaminovou sekvenci (17 za sebou jdoucích glutaminových zbytků), jejíž funkce je neznámá (van Heusden and Steensma, 2006).

O autoinhibiční funkci C terminálního segmentu u savčích isoform proteinu 14-3-3 není pochyb. Zda to samé platí i kvasničných isoform, BMH1 a BMH2, není jasné. Hlavním cílem této práce bylo studium vlastností a funkce C terminálního konce kvasničných isoform proteinu 14-3-3 pomocí rozličných biofyzikálních metod. Dynamický rozptyl světla, sedimentační analýza, časově-rozlišená fluorescence a gelová permeační chromatografie ukázaly, že zdánlivá velikost proteinu BMH je větší než u savčích isoform. Na druhou stranu sedimentační analýza potvrdila, že kvasniční isoformy, stejně jako savčí, se v roztoku nacházejí v dimerní formě. Fluorescenční měření ukázala, že vazba ligandu nezpůsobuje žádné konformační změny C terminálního segmentu molekuly BMH a že jeho odstranění nemá vliv na vazbu ligandu. Tyto výsledky naznačují, že na rozdíl od savčích isoform se C terminální

segment nenachází ve vazebném žlábků. C terminální konec kvasničných isoformů tedy na rozdíl od savčích nejspíše neplní funkci autoinhibitoru.

Tyto výsledky byly publikovány v časopise Biochemistry (viz. příloha č. 4, stránky 121-130):

Veisova, D., **Rezabkova, 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.

Můj podíl na této publikaci: Provedla jsem všechna měření sedimentačních rychlostí a sedimentačních rovnováh a následnou analýzu a interpretaci naměřených dat.

6. Závěr

Hlavním cílem této disertační práce bylo studium úlohy proteinů 14-3-3 v regulaci G-proteinové signální dráhy. Snažila jsem se pochopit strukturní podstatu mechanismu, kterým fosforylace a vazba proteinu 14-3-3 reguluje biologickou aktivitu a funkci proteinů RGS3 a fosducinu.

Pomocí biochemických (rekombinantní exprese a purifikace proteinů, bodová mutagenese) a biofyzikálních metod (stacionární a časově-rozlišená fluorescence, malouhlový rozptyl rentgenového záření, H/D výměna spojená s hmotnostní spektrometrií, analytická ultracentrifugace) se mi podařilo dosáhnout následujících výsledků:

1. Studium strukturní podstaty regulace funkce proteinu RGS3 fosforylací a vazbou proteinu 14-3-3.

- Výsledky měření tryptofanové fluorescence ukázaly, že samotná fosforylace proteinu RGS3 způsobuje značné strukturní změny v N terminální části molekuly, ne však v C koncové RGS doméně.
- Výsledky měření tryptofanové fluorescence dále ukázaly, že vazba proteinu 14-3-3 na fosforylovaný protein RGS3 ovlivňuje strukturu nejen N terminální části RGS3 v blízkosti fosforylačního místa, ale i strukturu RGS domény.
- Izolovaná RGS doména proteinu RGS3 je sama o sobě schopná slabé interakce s proteinem 14-3-3.
- Na základě dat z metod: H/D výměna spojená s hmotnostní spektrometrií, malouhlový rozptyl světla a měření vzdáleností pomocí Försterova rezonančního přenosu energie byl navržen 3D model komplexu RGS3/14-3-3.
- Tento model ukázal, že RGS doména proteinu RGS3 interaguje s málo konzervovanou oblastí proteinu 14-3-3 nacházející se mimo centrální kanál. To může vysvětlit specifitu, kterou vazební parneři vykazují ve výběru isoformy proteinu 14-3-3, na kterou se váží.
- Na základě tohoto modelu a dat z měření časově-rozlišené fluorescence je možné vysvětlit mechanismus, jakým vazba proteinu 14-3-3 na protein RGS3 blokuje interakci mezi proteinem RGS3 a $G\alpha$ podjednotkou. Vazba proteinu 14-3-3 jednak tuto interakci stericky blokuje a navíc způsobuje signifikantní konformační změnu RGS domény v okolí cysteinu 456, který je součástí interakčního povrchu s $G\alpha$ podjednotkou.

2. Studium strukturní podstaty regulace funkce fosducinu fosforylací a vazbou proteinu 14-3-3

- Měření časově-rozlišené tryptofanové a dansylové fluorescence ukázala, že fosforylace fosducinu sama o sobě způsobuje značné konformační změny nejen v N terminální doméně, kde se daná fosforylační místa nacházejí, ale překvapivě také v C terminální doméně. Je tedy pravděpodobné, že u volného, na $G_i\beta\gamma$ nenavázaného, fosducinu (na rozdíl od fosducinu vázaného na $G_i\beta\gamma$) spolu obě domény interagují.
- Vazba proteinu 14-3-3 ovlivňuje strukturu jak N terminální, tak i C terminální domény (v oblastech, kam se váže $G_i\beta\gamma$ podjednotka) fosforylovaného fosducinu, což naznačuje, že vazba proteinu 14-3-3 indukuje v obou doménách fosducinu značné konformační změny.
- Z výsledků časově-rozlišené fluorescence se dá tedy říci, že vazba proteinu 14-3-3 na fosducin stericky blokuje interakci mezi fosducinem a $G_i\beta\gamma$ a navíc způsobuje značné konformační změny v oblastech fosducinu, které jsou důležité pro vazbu na $G_i\beta\gamma$.

Závěrem mohu říci, že výsledky této disertační práce přispěly k objasnění mechanismů, kterými proteiny 14-3-3 regulují biologickou aktivitu a funkci proteinů RGS3 a fosducinu.

7. Seznam citované literatury

- Abramow-Newerly, M., Ming, H., Chidiac, P. (2006) Modulation of subfamily B/R4 RGS protein function by 14-3-3 proteins. *Cell Signal* 18, 2209-2222.
- Agarwal-Mawal, A., Qureshi, H.Y., Cafferty, P.W., Yuan, Z., Han, D., Lin, R., Paudel, H.K. (2003) 14-3-3 connects glycogen synthase kinase-3 beta to tau within a brain microtubule-associated tau phosphorylation complex. *J Biol Chem* 278, 12722-12728.
- Aitken, A., Baxter, H., Dubois, T., Clokie, S., Mackie, S., Mitchell, K., Peden, A., Zemlickova, E. (2002) Specificity of 14-3-3 isoform dimer interactions and phosphorylation. *Biochem Soc Trans* 30, 351-360.
- Aitken, A., Collinge, D.B., van Heusden, B.P., Isobe, T., Roseboom, P.H., Rosenfeld, G., Soll, J. (1992) 14-3-3 proteins: a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins. *Trends Biochem Sci* 17, 498-501.
- Aitken, A., Howell, S., Jones, D., Madrazo, J., Patel, Y. (1995) 14-3-3 alpha and delta are the phosphorylated forms of raf-activating 14-3-3 beta and zeta. In vivo stoichiometric phosphorylation in brain at a Ser-Pro-Glu-Lys MOTIF. *J Biol Chem* 270, 5706-5709.
- Balasubramanian, N., Levay, K., Keren-Raifman, T., Faurobert, E., Slepak, V.Z. (2001) Phosphorylation of the regulator of G protein signaling RGS9-1 by protein kinase A is a potential mechanism of light- and Ca²⁺-mediated regulation of G protein function in photoreceptors. *Biochemistry* 40, 12619-12627.
- Bauer, P.H., Muller, S., Puzicha, M., Pippig, S., Obermaier, B., Helmreich, E.J., Lohse, M.J. (1992) Phosducin is a protein kinase A-regulated G-protein regulator. *Nature* 358, 73-76.
- Beetz, N., Harrison, M.D., Brede, M., Zong, X., Urbanski, M.J., Sietmann, A., Kaufling, J., Lorkowski, S., Barrot, M., Seeliger, M.W., Vieira-Coelho, M.A., Hamet, P., Gaudet, D., Seda, O., Tremblay, J., Kotchen, T.A., Kaldunski, M., Nusing, R., Szabo, B., Jacob, H.J., Cowley, A.W., Jr., Biel, M., Stoll, M., Lohse, M.J., Broeckel, U., Hein, L. (2009) Phosducin influences sympathetic activity and prevents stress-induced hypertension in humans and mice. *J Clin Invest* 119, 3597-3612.
- Beetz, N., Hein, L. (2011) The physiological roles of phosducin: from retinal function to stress-dependent hypertension. *Cell Mol Life Sci* 68, 599-612.
- Benzing, T., Kottgen, M., Johnson, M., Schermer, B., Zentgraf, H., Walz, G., Kim, E. (2002) Interaction of 14-3-3 protein with regulator of G protein signaling 7 is dynamically regulated by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 277, 32954-32962.
- Benzing, T., Yaffe, M.B., Arnould, T., Sellin, L., Schermer, B., Schilling, B., Schreiber, R., Kunzelmann, K., Leparc, G.G., Kim, E., Walz, G. (2000) 14-3-3 interacts with regulator of G protein signaling proteins and modulates their activity. *J Biol Chem* 275, 28167-28172.
- Bridges, D., Moorhead, G.B. (2004) 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. *Sci STKE* 2004, re10.
- Bryan, R.K. (1990) Maximum entropy analysis of oversampled data problems. *Eur. Biophys. J.* 18, 165-174.
- Burgon, P.G., Lee, W.L., Nixon, A.B., Peralta, E.G., Casey, P.J. (2001) Phosphorylation and nuclear translocation of a regulator of G protein signaling (RGS10). *J Biol Chem* 276, 32828-32834.
- Conklin, D.S., Galaktionov, K., Beach, D. (1995) 14-3-3 proteins associate with cdc25 phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7892-7896.
- Cunningham, M.L., Waldo, G.L., Hollinger, S., Hepler, J.R., Harden, T.K. (2001) Protein kinase C phosphorylates RGS2 and modulates its capacity for negative regulation of G_α11 signaling. *J Biol Chem* 276, 5438-5444.
- Danner, S., Lohse, M.J. (1996) Phosducin is a ubiquitous G-protein regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10145-10150.

- Ferl, R.J., Manak, M.S., Reyes, M.F. (2002) The 14-3-3s. *Genome Biol* 3, REVIEWS3010.
- Franke, D., Svergun, D.I. (2009) DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of Applied Crystallography* 42, 342-346.
- Furukawa, T., Morrow, E.M., Cepko, C.L. (1997) Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell* 91, 531-541.
- Ganguly, S., Gastel, J.A., Weller, J.L., Schwartz, C., Jaffe, H., Namboodiri, M.A., Coon, S.L., Hickman, A.B., Rollag, M., Obsil, T., Beauverger, P., Ferry, G., Boutin, J.A., Klein, D.C. (2001) Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8083-8088.
- Ganguly, S., Weller, J.L., Ho, A., Chemineau, P., Malpoux, B., Klein, D.C. (2005) Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N-acetyltransferase mediated by phosphoserine-205. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1222-1227.
- Gardino, A.K., Smerdon, S.J., Yaffe, M.B. (2006) Structural determinants of 14-3-3 binding specificities and regulation of subcellular localization of 14-3-3-ligand complexes: a comparison of the X-ray crystal structures of all human 14-3-3 isoforms. *Semin Cancer Biol* 16, 173-182.
- Garrison, T.R., Zhang, Y., Pausch, M., Apanovitch, D., Aebersold, R., Dohlman, H.G. (1999) Feedback phosphorylation of an RGS protein by MAP kinase in yeast. *J Biol Chem* 274, 36387-36391.
- Gaudet, R., Bohm, A., Sigler, P.B. (1996) Crystal structure at 2.4 angstroms resolution of the complex of transducin betagamma and its regulator, phosducin. *Cell* 87, 577-588.
- Gaudet, R., Savage, J.R., McLaughlin, J.N., Willardson, B.M., Sigler, P.B. (1999) A molecular mechanism for the phosphorylation-dependent regulation of heterotrimeric G proteins by phosducin. *Mol Cell* 3, 649-660.
- Gegenbauer, K., Elia, G., Blanco-Fernandez, A., Smolenski, A. (2012) Regulator of G-protein signaling 18 integrates activating and inhibitory signaling in platelets. *Blood* 119, 3799-3807.
- Giorelli, M., Livrea, P., Defazio, G., Iacovelli, L., Capobianco, L., Picascia, A., Sallese, M., Martino, D., Aniello, M.S., Trojano, M., De Blasi, A. (2002) Interferon beta-1a counteracts effects of activation on the expression of G-protein-coupled receptor kinases 2 and 3, beta-arrestin-1, and regulators of G-protein signalling 2 and 16 in human mononuclear leukocytes. *Cell Signal* 14, 673-678.
- Hargrave, P.A., McDowell, J.H. (1992) Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors. *FASEB J* 6, 2323-2331.
- He, W., Cowan, C.W., Wensel, T.G. (1998) RGS9, a GTPase accelerator for phototransduction. *Neuron* 20, 95-102.
- Hepler, J.R. (1999) Emerging roles for RGS proteins in cell signalling. *Trends Pharmacol Sci* 20, 376-382.
- Heximer, S.P., Watson, N., Linder, M.E., Blumer, K.J., Hepler, J.R. (1997) RGS2/G0S8 is a selective inhibitor of Gqalpha function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14389-14393.
- Chen, S., Wang, Q.L., Nie, Z., Sun, H., Lennon, G., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Zack, D.J. (1997) Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron* 19, 1017-1030.
- Chidiac, P., Roy, A.A. (2003) Activity, regulation, and intracellular localization of RGS proteins. *Receptors Channels* 9, 135-147.
- Ichimura, T., Isobe, T., Okuyama, T., Takahashi, N., Araki, K., Kuwano, R., Takahashi, Y. (1988) Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7084-7088.

- Ishii, M., Kurachi, Y. (2003) Physiological actions of regulators of G-protein signaling (RGS) proteins. *Life Sci* 74, 163-171.
- Jones, D.H., Ley, S., Aitken, A. (1995) Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins. *FEBS Lett* 368, 55-58.
- Koelle, M.R., Horvitz, H.R. (1996) EGL-10 regulates G protein signaling in the *C. elegans* nervous system and shares a conserved domain with many mammalian proteins. *Cell* 84, 115-125.
- 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. *Journal of Applied Crystallography* 39, 277-286.
- 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. *Journal of Applied Crystallography* 36, 1277-1282.
- Kosloff, M., Travis, A.M., Bosch, D.E., Siderovski, D.P., Arshavsky, V.Y. (2011) Integrating energy calculations with functional assays to decipher the specificity of G protein-RGS protein interactions. *Nat Struct Mol Biol* 18, 846-853.
- Krauss, G. (2001) *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. Wiley-Wch, New York
- Lakowicz, J.R. (2006) *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed. Springer, New York.
- Lee, B.Y., Thulin, C.D., Willardson, B.M. (2004) Site-specific phosphorylation of phosducin in intact retina. Dynamics of phosphorylation and effects on G protein beta gamma dimer binding. *J Biol Chem* 279, 54008-54017.
- Lee, R.H., Brown, B.M., Lolley, R.N. (1984) Light-induced dephosphorylation of a 33K protein in rod outer segments of rat retina. *Biochemistry* 23, 1972-1977.
- Lee, R.H., Brown, B.M., Lolley, R.N. (1990a) Protein kinase A phosphorylates retinal phosducin on serine 73 in situ. *J Biol Chem* 265, 15860-15866.
- Lee, R.H., Fowler, A., McGinnis, J.F., Lolley, R.N., Craft, C.M. (1990b) Amino acid and cDNA sequence of bovine phosducin, a soluble phosphoprotein from photoreceptor cells. *J Biol Chem* 265, 15867-15873.
- Lee, R.H., Lieberman, B.S., Lolley, R.N. (1987) A novel complex from bovine visual cells of a 33,000-dalton phosphoprotein with beta- and gamma-transducin: purification and subunit structure. *Biochemistry* 26, 3983-3990.
- Lee, R.H., Lieberman, B.S., Lolley, R.N. (1990c) Retinal accumulation of the phosducin/T beta gamma and transducin complexes in developing normal mice and in mice and dogs with inherited retinal degeneration. *Exp Eye Res* 51, 325-333.
- Li, X., Chen, S., Wang, Q., Zack, D.J., Snyder, S.H., Borjigin, J. (1998) A pineal regulatory element (PIRE) mediates transactivation by the pineal/retina-specific transcription factor CRX. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1876-1881.
- 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.
- Loew, A., Ho, Y.K., Blundell, T., Bax, B. (1998) Phosducin induces a structural change in transducin beta gamma. *Structure* 6, 1007-1019.
- Lolley, R.N., Lee, R.H. (1990) Cyclic GMP and photoreceptor function. *FASEB J* 4, 3001-3008.
- Moore, B.W., McGregor, D. (1965) Chromatographic and Electrophoretic Fractionation of Soluble Proteins of Brain and Liver. *J Biol Chem* 240, 1647-1653.
- Nakano, K., Chen, J., Tarr, G.E., Yoshida, T., Flynn, J.M., Bitensky, M.W. (2001) Rethinking the role of phosducin: light-regulated binding of phosducin to 14-3-3 in rod inner segments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4693-4698.

- Niu, J., Scheschonka, A., Druey, K.M., Davis, A., Reed, E., Kolenko, V., Bodnar, R., Voyno-Yasenetskaya, T., Du, X., Kehrl, J., Dulin, N.O. (2002) RGS3 interacts with 14-3-3 via the N-terminal region distinct from the RGS (regulator of G-protein signalling) domain. *Biochem J* 365, 677-684.
- 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.
- Obsil, T., Obsilova, V. (2011) Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Semin Cell Dev Biol* 22, 663-672.
- Obsilova, V., Herman, P., Vecer, J., Sulc, M., Teisinger, J., Obsil, T. (2004) 14-3-3zeta C-terminal stretch changes its conformation upon ligand binding and phosphorylation at Thr232. *J Biol Chem* 279, 4531-4540.
- Ogier-Denis, E., Pattingre, S., El Benna, J., Codogno, P. (2000) Erk1/2-dependent phosphorylation of Galpha-interacting protein stimulates its GTPase accelerating activity and autophagy in human colon cancer cells. *J Biol Chem* 275, 39090-39095.
- 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.
- Porter, G.W., Khuri, F.R., Fu, H. (2006) Dynamic 14-3-3/client protein interactions integrate survival and apoptotic pathways. *Semin Cancer Biol* 16, 193-202.
- Rezabkova, L., Boura, E., Herman, P., Vecer, J., Bourova, L., Sulc, M., Svoboda, P., Obsilova, V., Obsil, T. (2010) 14-3-3 protein interacts with and affects the structure of RGS domain of regulator of G protein signaling 3 (RGS3). *J Struct Biol* 170, 451-461.
- Rezabkova, L., Kacirova, M., Sulc, M., Herman, P., Vecer, J., Stepanek, M., Obsilova, V., Obsil, T. (2012) Structural modulation of phospho-ducin by phosphorylation and the 14-3-3 protein binding. *Biophys J*, přijato k otištění
- Rezabkova, L., Man, P., Novak, P., Herman, P., Vecer, J., Obsilova, V., Obsil, T. (2011) Structural basis for the 14-3-3 protein-dependent inhibition of the regulator of G protein signaling 3 (RGS3) function. *J Biol Chem* 286, 43527-43536.
- 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.
- Romero, D.G., Zhou, M.Y., Yanes, L.L., Plonczynski, M.W., Washington, T.R., Gomez-Sanchez, C.E., Gomez-Sanchez, E.P. (2007) Regulators of G-protein signaling 4 in adrenal gland: localization, regulation, and role in aldosterone secretion. *J Endocrinol* 194, 429-440.
- Rosenquist, M., Alsterfjord, M., Larsson, C., Sommarin, 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.
- Ross, E.M., Wilkie, T.M. (2000) GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu Rev Biochem* 69, 795-827.
- Schuck, P. (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J* 78, 1606-1619.
- Schuck, P. (2003) On the analysis of protein self-association by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *Anal Biochem* 320, 104-124.
- Siderovski, D.P., Hessel, A., Chung, S., Mak, T.W., Tyers, M. (1996) A new family of regulators of G-protein-coupled receptors? *Curr Biol* 6, 211-212.

- Siderovski, D.P., Willard, F.S. (2005) The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int J Biol Sci* 1, 51-66.
- 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.
- Silhan, J., Vacha, P., Strnadova, P., Vecer, J., Herman, P., Sulc, M., Teisinger, J., Obsilova, V., Obsil, T. (2009) 14-3-3 protein masks the DNA binding interface of forkhead transcription factor FOXO4. *J Biol Chem* 284, 19349-19360.
- Sjogren, B., Blazer, L.L., Neubig, R.R. (2010) Regulators of G protein signaling proteins as targets for drug discovery. *Prog Mol Biol Transl Sci* 91, 81-119.
- Snow, B.E., Antonio, L., Suggs, S., Gutstein, H.B., Siderovski, D.P. (1997) Molecular cloning and expression analysis of rat Rgs12 and Rgs14. *Biochem Biophys Res Commun* 233, 770-777.
- Snow, B.E., Krumins, A.M., Brothers, G.M., Lee, S.F., Wall, M.A., Chung, S., Mangion, J., Arya, S., Gilman, A.G., Siderovski, D.P. (1998) A G protein gamma subunit-like domain shared between RGS11 and other RGS proteins specifies binding to Gbeta5 subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13307-13312.
- Song, L., De Sarno, P., Jope, R.S. (1999) Muscarinic receptor stimulation increases regulators of G-protein signaling 2 mRNA levels through a protein kinase C-dependent mechanism. *J Biol Chem* 274, 29689-29693.
- Soundararajan, M., Willard, F.S., Kimple, A.J., Turnbull, A.P., Ball, L.J., Schoch, G.A., Gileadi, C., Fedorov, O.Y., Dowler, E.F., Higman, V.A., Hutsell, S.Q., Sundstrom, M., Doyle, D.A., Siderovski, D.P. (2008) Structural diversity in the RGS domain and its interaction with heterotrimeric G protein alpha-subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6457-6462.
- Strohalm, M., Kavan, D., Novak, P., Volny, M., Havlicek, V. (2010) mMass 3: a cross-platform software environment for precise analysis of mass spectrometric data. *Anal Chem* 82, 4648-4651.
- Stuebe, S., Wieland, T., Kraemer, E., Stritzky, A., Schroeder, D., Seekamp, S., Vogt, A., Chen, C.K., Patten, M. (2008) Sphingosine-1-phosphate and endothelin-1 induce the expression of rgs16 protein in cardiac myocytes by transcriptional activation of the rgs16 gene. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 376, 363-373.
- Svergun, D.I. (1997) Restoring three-dimensional structure of biopolymers from solution scattering. *Journal of Applied Crystallography* 30, 792-797.
- 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.
- Tesmer, J.J., Berman, D.M., Gilman, A.G., Sprang, S.R. (1997) Structure of RGS4 bound to AlF4--activated G(i alpha1): stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. *Cell* 89, 251-261.
- Thulin, C.D., Savage, J.R., McLaughlin, J.N., Truscott, S.M., Old, W.M., Ahn, N.G., Resing, K.A., Hamm, H.E., Bitensky, M.W., Willardson, B.M. (2001) Modulation of the G protein regulator phosphodiesterase by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation and 14-3-3 protein binding. *J Biol Chem* 276, 23805-23815.
- Tran, T., Paz, P., Velichko, S., Cifrese, J., Belur, P., Yamaguchi, K.D., Ku, K., Mirshahpanah, P., Reder, A.T., Croze, E. (2010) Interferonbeta-1b Induces the Expression of RGS1 a Negative Regulator of G-Protein Signaling. *Int J Cell Biol* 2010, 529376.
- Truong, A.B., Masters, S.C., Yang, H., Fu, H. (2002) Role of the 14-3-3 C-terminal loop in ligand interaction. *Proteins* 49, 321-325.

- Tzivion, G., Gupta, V.S., Kaplun, L., Balan, V. (2006) 14-3-3 proteins as potential oncogenes. *Semin Cancer Biol* 16, 203-213.
- Van Der Heide, L.P., Hoekman, M.F., Smidt, M.P. (2004) The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J* 380, 297-309.
- Van Der Hoeven, P.C., Van Der Wal, J.C., Ruurs, P., Van Blitterswijk, W.J. (2000) Protein kinase C activation by acidic proteins including 14-3-3. *Biochem J* 347 Pt 3, 781-785.
- van Hemert, M.J., Steensma, H.Y., van Heusden, G.P. (2001) 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* 23, 936-946.
- van Heusden, G.P., Steensma, H.Y. (2006) Yeast 14-3-3 proteins. *Yeast* 23, 159-171.
- Veisova, D., Rezabkova, 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.
- Ward, R.J., Milligan, G. (2005) A key serine for the GTPase-activating protein function of regulator of G protein signaling proteins is not a general target for 14-3-3 interactions. *Mol Pharmacol* 68, 1821-1830.
- Watson, N., Linder, M.E., Druey, K.M., Kehrl, J.H., Blumer, K.J. (1996) RGS family members: GTPase-activating proteins for heterotrimeric G-protein alpha-subunits. *Nature* 383, 172-175.
- 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.
- Wilkins, J.F., Bitensky, M.W., Willardson, B.M. (1996) Regulation of the kinetics of phosducin phosphorylation in retinal rods. *J Biol Chem* 271, 19232-19237.
- Willardson, B.M., Wilkins, J.F., Yoshida, T., Bitensky, M.W. (1996) Regulation of phosducin phosphorylation in retinal rods by Ca²⁺/calmodulin-dependent adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1475-1479.
- 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.
- Xie, S., Li, J., Wang, J.H., Wu, Q., Yang, P., Hsu, H.C., Smythies, L.E., Mountz, J.D. (2010) IL-17 activates the canonical NF-kappaB signaling pathway in autoimmune B cells of BXD2 mice to upregulate the expression of regulators of G-protein signaling 16. *J Immunol* 184, 2289-2296.
- Yaffe, M.B. (2002) How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett* 513, 53-57.
- 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 U S A* 103, 17237-17242.
- Zhang, L., Chen, J., Fu, H. (1999) Suppression of apoptosis signal-regulating kinase 1-induced cell death by 14-3-3 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8511-8515.
- Zhang, P., Mende, U. (2011) Regulators of G-protein signaling in the heart and their potential as therapeutic targets. *Circ Res* 109, 320-333.
- Zheng, B., De Vries, L., Gist Farquhar, M. (1999) Divergence of RGS proteins: evidence for the existence of six mammalian RGS subfamilies. *Trends Biochem Sci* 24, 411-414.

Zhu, X., Craft, C.M. (1998) Interaction of phosducin and phosducin isoforms with a 26S proteasomal subunit, SUG1. *Mol Vis* 4, 13.

Zhu, X., Craft, C.M. (2000a) The carboxyl terminal domain of phosducin functions as a transcriptional activator. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 504-509.

Zhu, X., Craft, C.M. (2000b) Modulation of CRX transactivation activity by phosducin isoforms. *Mol Cell Biol* 20, 5216-5226.

8. Publikace

8.1 Příloha 1: Vliv vazby proteinu 14-3-3 na RGS doménu Regulátoru G-proteinové signalizace (RGS3).

Publikace I

Rezabkova, L., Boura, E., Herman, P., Vecer, J., Bourova, L., Sulc, M., Svoboda, P., Obsilova, V., Obsil, T. (2010) 14-3-3 protein interacts with and affects the structure of RGS domain of regulator of G protein signaling 3 (RGS3). *J Struct Biol* 170, 451-461.

8.2 Příloha 2: Struktura komplexu RGS3/14-3-3: Proč vazba proteinu 14-3-3 inhibuje funkci regulátoru G-proteinové signalizace 3 (RGS3)?

Publikace 2

Rezabkova, L., Man, P., Novak, P., Herman, P., Vecer, J., Obsilova, V., Obsil, T. (2011) Structural basis for the 14-3-3 protein-dependent inhibition of the regulator of G protein signaling 3 (RGS3) function. *J Biol Chem* 286, 43527-43536.

8.3 Příloha 3: Strukturní změny fosducinu způsobené fosforylací a vazbou proteinu 14-3-3

Publikace III

Rezabkova, L., Kacirova, M., Sulc, M., Herman, P., Vecer, J., Stepanek, M., Obsilova, V., Obsil, T. (2012) Structural modulation of phosducin by phosphorylation and the 14-3-3 protein binding, Biophys. J., přijato k otištění

8.4 Příloha 4: Studium funkce a vlastností C terminálního segmentu kvasničných isoform proteinu 14-3-3 (BMH1 a BMH2)

Publikace IV

Veisova, D., **Rezabkova, 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.

