

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Doktorský studijní program: Fyzikální chemie



Mgr. Dalibor Košek

Úloha protein-proteinových interakcí v regulaci signálních proteinů a enzymů

Role of protein-protein interactions in regulation of signalling proteins and enzymes

Dizertační práce

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

Praha, 2015

Prohlášení:

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

V Praze, 8.5.2015

Podpis:

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval všem studentům i pracovníkům naší a všech spolupracujících laboratoří za vytvoření velmi příjemného pracovního prostředí.

Největší dík patří mému školiteli prof. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. za odborné vedení, možnost vypracování této práce, trpělivost, cenné rady, věnovaný čas a energii, které mi poskytl. Dále Mgr. Lence Řežábkové, Ph.D. za spolupráci, rady i pomoc v začátcích tohoto projektu.

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. Taktéž děkuji RNDr. Petru Manovi, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu AV ČR za hmotnostně-spektrometrická měření.

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

V neposlední řadě bych pak rád poděkoval své rodině a svým blízkým za podporu a všestrannou pomoc během mých studií.

Abstrakt CZ

Mezi všemi způsoby regulace signalizace mají protein-proteinové interakce přednostní postavení. Jejich studium v různých podmínkách je logickým a důležitým krokem v pochopení molekulárního mechanismu funkcí jednotlivých regulačních procesů.

Tato práce je zaměřena na studium tří takových procesů: ASK1 proteinkinasa, důležitý iniciátor proapoptotických dějů, je za fyziologických podmínek udržována v neaktivním stavu v komplexu s proteinem 14-3-3 a TRX1. Za podmínek oxidačního stresu však tyto proteiny disociují a proteinkinasa se stává aktivní. Dalším procesem je interakce proteinu 14-3-3 s fosducinem a studium jeho úlohy v negativní regulaci G proteinové signalizace v rámci biochemie zraku. Třetí proces je aktivace Nth1 prostřednictvím interakce s Bmh1 a vápníkových kationů. Práce si klade za cíl pomocí různých biochemických a biofyzikálních metod, zejména bodové mutagenese, analytické ultracentrifugace, malouhlového rozptylu rentgenového záření a fluorescenční spektroskopie přispět k objasnění strukturní podstaty výše popsaných dějů a vysvětlit úlohu protein-proteinových interakcí v jejich regulaci.

Na základě výsledků získaných těmito metodami byly zjištěny strukturní informace o tvaru a stechiometrii komplexů TRX1 i proteinu 14-3-3 s odpovídajícími vazebnými doménami ASK1 včetně jejich zdánlivých disociačních konstant. V případě komplexu ASK1 s TRX1 bylo možno též identifikovat pravděpodobné interakční rozhraní společně s kriticky důležitými aminokyselinami, na nichž jsou interakce závislé. V rámci studia komplexu 14-3-3:fosducin byly zjištěny vazebné afinity separovaných domén fosducinu k proteinu 14-3-3, přičemž tímto způsobem byly objeveny konkrétní oblasti zodpovědné za stabilitu komplexu. U Nth1 a Bmh1 byla posuzována vazebná afinita těchto dvou proteinů v podmínkách s a bez vápenatých kationů. V souladu s těmito daty byla diskutována úloha studovaných interakcí a zhodnocen jejich význam v regulačních procesech, jež byly předmětem zájmu.

Abstrakt EN

Protein-protein interactions have an exceptional position among other mechanisms in the regulation of signal transduction. Their systematic investigation is very important and logical step in the process of understanding to the transduction and its mechanisms at a molecular level.

During my Ph.D. I was particularly interested in three important processes. ASK1 kinase is well-known initiator of the apoptosis. Under physiological conditions it is maintained in an inactive state by its two interaction partners the 14-3-3 protein and TRX1. These two proteins dissociate in the presence of reactive oxygen species by unclear mechanism and the kinase is therefore activated. The next process is an interaction between the 14-3-3 protein and phosducin and investigation of their role in the G protein signalling especially important in the biochemistry of vision. The third process is an activation of protein Nth1 through the interaction with Bmh1, yeast analog of the 14-3-3 protein, and calcium cations. I employed various biophysical method, particularly analytical ultracentrifugation, in order to explain molecular mechanisms of described processes. These techniques were used to solve the low-resolution structures of complexes TRX1 and the 14-3-3 protein with corresponding binding domains of ASK1. These structures confirmed binding stoichiometries acquired from sedimentation velocity analysis. This analysis also provided binding affinity in terms of K_d and suggested an interaction interface between binding partners. In the case of the ASK1:TRX1 complex the main amino acid residues responsible for the interaction were identified together with the fact that TRX1 binds in a close proximity of ASK1 dimerization interface. In the case of phosducin, I studied the influence of different parts of the protein on the interaction with the 14-3-3 protein. I discovered that the N-terminal part of phosducin is fully responsible for the stability of the complex where 14-3-3 sterically occludes the binding interface for another binding partners. In the case of Nth1 and Bmh1, I studied the binding affinity between those proteins depending of the presence of calcium ions. Results suggested that there is no influence of calcium ions on this interaction.

Seznam zkratek

14-3-3 Δ C	označení pro konstrukt 14-3-3 ζ bez C-koncového flexibilního segmentu
AANAT	serotonin-N-acetyltransferasa
ASK1	zkratka z anglického "signal-regulating kinase 1"
ASK1-CD	označení pro konstrukt katalytické domény ASK1 společně s vazebným motivem pro protein 14-3-3
ASK1-TBD	označení pro konstrukt domény ASK1 vázající thioredoxin 1
ASK1-TBD C250S	označení pro konstrukt domény ASK1 vázající thioredoxin 1 s mutací cysteinu 250 na serin
ASK1-CD	označení pro konstrukt zahrnující katalytickou doménu ASK1 a vazné místo pro protein 14-3-3
Ath1	vakuolární kyselá trehalasa 1
ATP	adenosin trifosfát
AUC	analytická ultracentrifugace
BAD	proapoptotický faktor, zkratka z angl. Bcl2-associated death promoter
Bmh1,2	kvasničné analogy proteinu 14-3-3
CaMKII	Ca ²⁺ /kalmodulin dependentní kinasa II
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CC	strukturní motiv označovaný z angl. "coil-coiled"
CD	cirkulární dichroismus
cGMP	cyklické guanosin monofosfát
D _{max}	maximální meziatomární vzdálenost v molekule
EMBL	Evropská laboratoř pro molekulární biologii
ERK	zkratka z anglického "extracellular signal-regulated kinase"
FOXO	transkripční faktor (z angl. Forkhead-box transcriptional factor O)
GB1	B1 doména imunoglobulin vázajícího proteinu G z bakterií <i>Streptococcus</i>

GPCR	receptor asociovaný s G proteinem (z anglického "G protein coupled receptor)
GTP	guanosin trifosfát
G _i αβγ	G protein transducinu
Gα, Gβ, Gγ	podjednotky heterotrimerního G proteinu
JNK/SAPK	c-Jun N-terminální kinasa
LB médium	médium podle Luria a Bertanniho
LC-MS/MS	hmotnostně spektrometrická analýza s fragmentací ionů spojená s kapalinovou chromatografií na reverzní fázi
MAP2K, MKK	mitogenem aktivovaná proteinkinasa kinasa
MAP3K, MEKK	mitogenem aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkinasa
Nth1,2	neutrální trehalasa 1 a 2
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PAK1	signální kinasa, zkratka z angl. p21-activated kinase
PBS	zkratka pro fosfátový pufr
PDB	veřejně dostupná databáze proteinových struktur (z angl. "Protein data bank")
PCR	polymerasová řetězová reakce
Pdc	fosducin
Pdc-CD	C-koncová část fosducinu
Pdc-ND	N-koncová nestrukturovaná část fosducinu
PKA	proteinkinasa C
PKC	proteinkinasa A
RAF kinasa	signální kinasa, zkratka z angl. "rapidly accelerated fibrosarcoma"
RAS kinasa	signální kinasa, zkratka z angl. "Rat sarcoma"
R _g	gyrační poloměr
RGS	regulátor G proteinové signalizace
SAXS	maloúhlový rozptyl rengenového záření (z ang. small-angle X-ray scattering)
S _r	standartní relativní odchylka
TEV	proteasa, zkratka z angl. Tobacco etch virus
TPS	trehalosfosfátsyntasa

TRAF	faktor asociovaný s receptorem pro tumor-nekrotizující faktor α
TRX	thioredoxin
TRX1	označení pro konstrukt thioredoxinu 1 s mutací cysteinu 72 za serin
TRX1 CS	dvojtý mutant TRX1, kde cysteiny 32 a 35 byly zmutovány na serin
TRX1 W31F	mutant TRX1, kde tryptofan 31 byl zmutován na fenylalanin
UDP	uridin difosfát
w/v	hmotnost podílu ku objemu celku
w/w	hmotnostní zlomek

Obsah

1. Úvod.....	12
2. Literární přehled.....	14
2.1 Protein-proteinové interakce.....	14
2.2 Signalizace.....	16
2.2.1 Mitogenem aktivované kinasy (MAPK).....	17
2.2.2 G proteinová signalizace.....	18
2.3 Proteiny 14-3-3	20
2.4 Regulace enzymové aktivity ASK1.....	25
2.4.1 ASK1.....	25
2.4.2 Interakce ASK1 s TRX1.....	27
2.4.3 Interakce ASK1 a proteinu 14-3-3.....	29
2.5 Fosducin.....	30
2.6 Neutrální trehalasa	34
3. Cíle práce.....	37
4. Materiál a metody	38
4.1 Přehled použitého materiálu a přístrojů.....	38
4.1.1 Chemikálie.....	38
4.1.2 Přístroje.....	39
4.1.3 Ostatní materiál.....	39
4.2 Exprese a purifikace proteinů.....	40
4.2.1 Exprese	40
4.2.2 Purifikace.....	42
4.2.3 Exprese a purifikace proteinu 14-3-3 a Bmh1.....	45
4.2.4 Exprese a purifikace ASK1.....	45
4.2.5 Exprese a purifikace TRX1.....	47
4.2.6 Exprese a purifikace fosducinu.....	47
4.2.7 Exprese a purifikace neutrální trehalasy 1.....	48
4.3 Analytická ultracentrifugace – metoda sedimentační rychlosti.....	49
4.4 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS).....	57
4.5 Měření časově rozlišeného dohasínání fluorescence.....	61
5. Výsledky.....	63

5.1 Interakce mezi ASK1-TBD a TRX1.....	63
5.1.1 Exprese a purifikace	63
5.1.2 Sedimentační analýza ASK1-TBD a TRX1.....	66
5.1.3 Časově rozlišené měření dohasínání fluorescence	71
5.1.3 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření	75
5.2 Komplex mezi ASK1-CD a proteinem 14-3-3.....	77
5.2.1 Exprese a purifikace	77
5.2.2 Sedimentační analýza ASK1-CD a proteinu 14-3-3.....	81
5.2.3 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření	84
5.3 Fosducin a protein 14-3-3.....	88
5.3.1 Exprese a purifikace.....	88
5.3.2 Sedimentační analýza komplexu fosducinu a proteinu 14-3-3.....	88
5.4 Nth1 + Bmh1.....	91
5.4.1 Exprese a purifikace.....	91
5.4.2 Sedimentační analýza, vliv vápníku na vazbu Nth1 a Bmh1.....	91
6. Diskuse.....	94
6.1 Vazba TRX1 na ASK1.....	95
6.2 Vazba proteinu 14-3-3 na ASK1.....	97
6.3 Vazba proteinu 14-3-3 na fosducin.....	100
6.4 Závislost tvorby komplexu Nth1:Bmh1 na přítomnosti vápníku.....	101
7. Závěr.....	102
Seznam citované literatury:.....	104
Přílohy:.....	112

Seznam publikací autora k této práci:

Kacirova M., Kosek D., Kadek A., Man P., Vecer J., Herman P., Obsilova V., Obsil T.: Structural characterization of phosducin and its complex with the 14-3-3 protein. *J. Biol. Chem.* (2015) **přijato k tisku** (DOI 10.1074/jbc.M115.636563).

Kosek, D., Kylarova, S., Psenakova, K., Rezabkova, L., Herman, P., Vecer, J., Obsilova, V., Obsil, T.: Biophysical and structural characterization of the thioredoxin-binding domain of protein kinase ASK1 and its interaction with reduced thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **289**, 24463-74 (2014).

Kopecka, M., Kosek, D., Kukacka, Z., Rezabkova, L., Man, P., Novak, P., Obsil, T., Obsilova, V.: Role of the EF-hand-like motif in the 14-3-3 protein-mediated activation of yeast neutral trehalase Nth1. *J. Biol. Chem.* **289**, 13948-61 (2014).

Další publikace autora:

Zhao H. et al.: A multilaboratory comparison of calibration accuracy and the performance of external references in analytical ultracentrifugation. *PLoS One* **10**, e0126420 (2015)

Obsilova, V., Kopecka, M., Kosek, D., Kacirova, M., Kylarova, S., Rezabkova, L., Obsil, T.: Mechanisms of the 14-3-3 protein function: regulation of protein function through conformational modulation. *Physiol. Res.* **63**, Suppl. 1, 155-164 (2014).

Busek, P., Stremenova, J., Sromova, L., Hilser, M., Balaziova, E., Kosek, D., Trylcova, J., Strnad, H., Krepela, E., Sedo, A.: Dipeptidyl peptidase-IV inhibits glioma cell growth independent of its enzymatic activity. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **44**, 738-747 (2012).

1. Úvod

Předkládaná práce je součástí širokých výzkumných projektů laboratoří prof. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D. na Přírodovědecké fakultě UK v Praze a RNDr. Veroniky Obšilové, Ph.D. na Fyziologickém ústavu Akademie věd, které spolu díky blízké tématice úzce spolupracují. V rámci práce byly studovány molekulární mechanismy regulace vybraných zástupců signálních proteinů a enzymů v závislosti na protein-proteinových interakcích s jejich popsányými interakčními partnery, přednostně s proteinem 14-3-3. Konkrétně byly studovány tři procesy významné jak z biologického, tak lékařského hlediska:

A) Aktivace signální proteinkinasy ASK1 je klíčovým iniciačním dějem ke spuštění MAPK signální kaskády vedoucí k buněčné apoptose, což má dalekosáhlé důsledky pro všechny aspekty buněčné i tkáňové fyziologie. Dva z proteinů podílejících se na aktivaci ASK1 jsou její fyziologické inhibitory thioredoxin 1 a protein 14-3-3, které interagují s neaktivní formou ASK1. Při oxidačním stresu v buňce však oba proteiny disociují, což vede k aktivaci enzymové aktivity. Ačkoliv je tento proces dlouho znám, absence strukturních dat nedovoluje vysvětlit molekulární mechanismus, jenž je důležitý pro pochopení podstaty změn vedoucí k aktivaci tohoto signálního proteinu. Studium strukturních mechanismů doprovázející aktivaci ASK1 je tedy nezbytné pro kompletní porozumění regulaci apoptosy a vysvětlení patologických stavů s ním spojených.

B) G proteinová signalizace má klíčovou roli v přenosech signálů přes cytoplasmatickou membránu. Poruchy v tomto procesu se v poslední době těší soustředěnému zájmu farmaceutického průmyslu, neboť jsou zodpovědné za řadu lidských nemocí. Jeden ze známých regulačních mechanismů G proteinové signalizace zahrnuje vazbu proteinu fosducinu na G $\beta\gamma$ podjednotku heterotrimerní G proteinu, čímž je signalizace negativně regulována. Fosducin je při tom dále negativně regulován dimerním vysoce konzervovaným proteinem 14-3-3, přičemž strukturní mechanismus tohoto děje důležitého zejména v biochemii zraku byl vysvětlen pouze částečně.

C) Trehalosa je důležitý zásobní disacharid a potenciální signální molekula důležitá pro regulaci růstu a metabolismu různých organismů. Její koncentrace je regulována enzymem trehalasou, která trehalosu štěpí na dvě molekuly glukosy. V případě kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* bylo zjištěno, že enzymová aktivita cytoplasmatické neutrální trehalasy je kromě koncentrací vápenatých iontů úzce regulována i interakcí s kvasničným analogem proteinu 14-3-3, Bmh1, přes dvě fosforylační místa na N-konci proteinu. Strukturní charakterizace této interakce je rovněž nedostatečně popsána.

Tato disertační práce si klade za cíl pomocí různých biochemických a biofyzikálních metod přispět k objasnění strukturní podstaty výše popsaných dějů a vysvětlit úlohu protein-proteinových interakcí v jejich regulaci. Speciální pozornost bude věnována strukturám proteinových komplexů s nízkým rozlišením, sledování změn konformace proteinů a jednotlivých aminokyselin s použitím fluorescenčních měření a zejména posuzování změn vazebných afinit na základě sedimentačních vlastností.

2. Literární přehled

2.1 *Protein-proteinové interakce*

Jedna z nejzákladnějších rolí moderní molekulární a strukturní biologie je odhalení a popis všech protein-proteinových interakcí v organismu, včetně odhalení jejich biologického významu (Bordner et al., 2005). Jsou centrálním bodem naprosté většiny biologických procesů a detekce konkrétních prvků primární, sekundární i terciární struktury, které přispívají ke specifitě a síle protein-proteinových interakcí, je tak naprosto zásadní problematika. Pro přesnější vysvětlení fyzikální podstaty těchto důležitých vazeb a sil, jimiž jsou udržovány, je nezbytné zabývat se studiem atomárních struktur proteinových systémů. Proteinové modely založené na takovýchto strukturních datech potom umožňují nahlédnout i do složitých mechanismů jako je modulace biologické funkce proteinu v buňce přes protein-proteinovou interakci. (Janin et al., 2005).

Protein-proteinové interakce jsou zpravidla velmi komplexním jevem a mohou být charakterizované podle své síly na slabé (transientní) a silné komplexotvorné vazby podle disociační konstanty charakteristické pro daný systém. Silné komplexotvorné interakce se pohybují v řádu nano- a pikomolárních. Transientní komplexotvorné interakce jsou typické svou omezenou životností v časové škále existence proteinu, obvykle s disociační konstantou v oblasti mikromolární a vyšší. Dále je lze dělit podle své podstaty na kovalentní a nekovalentní podle typů vazeb nebo rozsahu, tvaru a velikosti interakčního povrchu (Fernandez et al., 2003).

Mezi charakteristickými komplementárními povrchy vazebných partnerů, takzvaném interakčním rozhraní, se vytváří množství elektrostatických, hydrofobních i vodíkových vazeb, jež jsou zásadními prvky rozhodujícími o charakteru protein-proteinové vazby. Ačkoliv jsou považovány za slabé vazebné interakce, jejich veliké množství po celém interakčním rozhraní z nich činí rozhodující faktory pro stabilitu celé interakce. V některých případech mohou být doprovázené i kovalentními disulfidovými vazbami mezi thiolovými skupinami cysteinů. Dalším faktorem může být i lokální flexibilita proteinového řetězce, který získává po vazbě specifickou indukovanou konformaci přispívající k vazebné stabilitě (Jones et al., 1996) Bylo ukázáno, že

průměrné rozhraní pro protein-proteinovou interakci zabírá povrch 1200-2000 Å², přičemž je předpokládáno, že se zvyšujícím se interakčním povrchem roste specificita a síla interakce. Komplexy s největšími vazebnými povrchy lze nalézt především u signálních transdukčních systémů jako G proteiny nebo signální proteasy (Janin et al., 1990, Horton et al., 1992).

Interakční rozhraní mezi proteiny typicky obsahuje hydrofobní a hluboko uložené nepolární oblasti chráněné před přístupem molekul vody. Hydrofobicita je jednou z hnacích sil vazeb mezi proteiny a významný faktor přispívající ke stabilitě protein-proteinových komplexů (Young et al., 1994). Oblasti proteinů se zvýšeným zastoupením nepolárních aminokyselin exponují do okolí nepolární povrch, který není schopný vytvářet s molekulami rozpouštědla vodíkové vazby. To ústí v reorientaci molekul rozpouštědla v okolí tak, aby celková síť vodíkových můstků mezi molekulami rozpouštědla byla narušena co možná nejméně a molekuly mohly tvořit s dalšími molekulami maximální počet vodíkových vazeb. V důsledku se různé nepolární oblasti shlukují dohromady, aby exponovaný hydrofobní povrch byl minimální, což je též podpořeno vzájemnou prostorovou komplementaritou. Tento proces je termodynamicky samovolný, avšak poháněný především nárůstem entropie v systému díky snižování počtu molekul vody v uspořádaném stavu obklopujícím nepolární povrchy (Silverstain et al., 1998). Mezi nepolárními úseky proteinů se dále vytváří van der Waalsovi vazby působící jako další stabilizační faktor.

Protože interakční povrchy jsou si velmi často navzájem i elektrostaticky komplementární, jsou elektrostatické síly dalším stabilizačním prvkem v protein-proteinových interakcích (Sheinerman et al., 2000). Vazba je zprostředkována zpravidla přes postranní řetězce disociovaných forem aminokyselin na evolučně konzervovaných pozicích (nejčastěji aspartátů, glutamátů, lyzinů, argininů a histidinů), které mezi sebou navzájem tvoří solné můstky. Ty se ze své hydrofilní podstaty vyskytují zejména na povrchu proteinu v místech přístupných rozpouštědlu a jejich tvorba je silně závislá na hodnotě pH okolního prostředí. Solné můstky mohou mít podle geometrie vazby jak stabilizační, tak destabilizační efekt, kdy brání tvorbě jiných vazeb.

Vodíkové vazby jsou slabé elektrostatické interakce typu dipól-dipól mezi polárními molekulami. Ačkoliv mají směrový charakter, nejedná se o kovalentní vazbu. Vzniká mezi atomem vodíku s vysokým kladným parciálním nábojem, který je přitahován jiným vysoce elektronegativním atomem například dusíkem, kyslíkem nebo

fluorem s parciálním záporným nábojem a to jak intramolekulárně, tak mezimolekulárně. Ve strukturách proteinů mají nezastupitelnou stabilizační úlohu, stejně tak jsou nejčastějším případem interakce s molekulami rozpouštědla (Jones et al. 1997)

Všechny tyto příspěvky k protein-proteinové interakci jsou závislé zpravidla na omezeném počtu konzervovaných aminokyselin v řetězci proteinu, jež jsou pro vznik vazby potom naprosto zásadní, přispívají k celkové vazebné energii nejvyšším dílem. Jejich bodovou mutací zpravidla za alanin, který vyruší účinky postranního řetězce, ale zároveň zachová omezenou flexibilitu hlavního řetězce, je vazba signifikantně narušena. Tato specifická důležitá místa se v anglické literatuře označují jako takzvané "hot spots" (Conte et al., 1999). Mezi aminokyselinami tvořícími interakční povrch se vyskytují přibližně z 9,5% (Thornton et al., 2001).

Pochopení lokalizace jednotlivých kritických aminokyselin na interakčním rozhraní protein-proteinových interakcí je společně s řešením atomární struktury těchto systémů naprosto zásadní pro racionální vývoj nízkomolekulárních látek sloužících jako inhibitory nebo modulátory proteinových vazeb. Mohou sloužit jako potencionální léčebné přípravky, stejně tak lze navrhnout makromolekuly mimikující jiné interakční povrchy pro zvýšení vazebné afinity s proteinem, nebo teoretické algoritmy předpovídající možné interakce (Bogan et al., 1998). Mnoho mutací v genomu, jež mají za důsledek modifikaci "hot spot" aminokyselin, je příčinou závažných onemocnění a deficitů.

Pro sdílení všech rozřešených struktur krystalografickou analýzou nebo nukleární magnetickou rezonancí byla vytvořena elektronická databáze PDB poskytující možnost archivace i sdílení proteinových modelů, kde je každému modelu přiřazen unikátní kód, pod nímž může být veřejně dohledán (Berman et al., 2000).

2.2 Signalizace

Pro všechny buňky živých organismů je charakteristické, že mají vyvinuté postupy adaptace svého aktuálního chování na změny prostředí. Komunikace buněčných dějů s prostředím je dosaženo prostřednictvím velkého množství evolučně konzervovaných signálních cest, které zachytávají stimul, transformují jej na vnitro buněčný signál a přenáší jej dále tím způsobem, že receptor aktivuje specifické proteiny

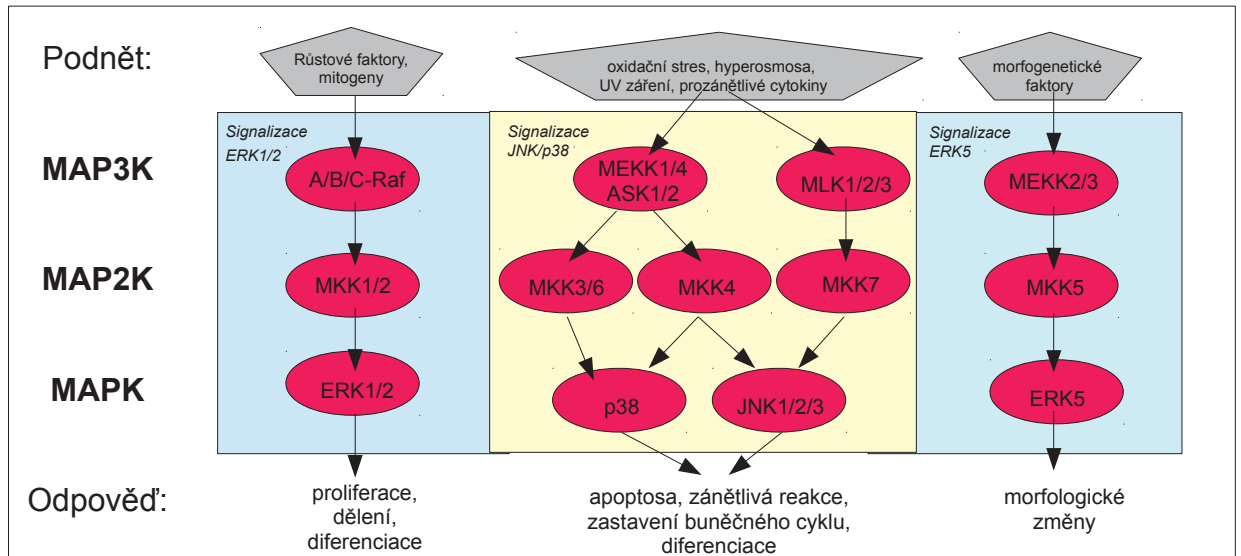
či produkuje takzvané "druhé posly" propagující signál dále. Tímto lineárním vedením signálu je zajištěna jeho přísná mnohaúrovňová regulace, amplifikace a diverzifikace. Na konci této "signální kaskády" jsou zpravidla aktivovány efektorové proteiny, jež přímo ovlivňují různé buněčné procesy. Počáteční stimul přitom může mít jak extracelulární tak intracelulární původ a různý charakter od elektromagnetického záření, přes změnu teploty nebo extracelulární proteiny k nízkomolekulárním látkám a další. S odhalováním stále nových a nových komponent signálních kaskád začalo být zřejmé, že jednotlivé signalizace nejsou individuálními procesy, ale že navzájem tvoří komplexní integrovanou signální síť. Repertoár proteinů, které zajišťují takovýto přenos signálů, patří mezi nejdůležitější regulační prvky všech buněčných pochodů a jejich výzkum má zásadní důležitost pro objasnění zprostředkovaných funkcí i patologií. (Jordan et al., 2000)

Mechanismy přenosu signálu mohou mít různý charakter, nicméně jejich regulace je zpravidla kontrolována pomocí protein-proteinových interakcí. Dominantní postavení mezi signálními mechanismy mají fosforylace zprostředkovaná signálními proteinkinasami, jež přenáší fosfát z ATP na serin, threonin nebo tyrosin cílového proteinu, a G proteinová signalizace.

2.2.1 Mitogenem aktivované kinasy (MAPK)

Rodina mitogenem-aktivovaných proteinkinas (MAPK) patří do repertoáru cytoplasmatických signálních molekul tvořících signální kaskádu alespoň o třech úrovních, které zpravidla vedou k aktivaci jedné multifunkční MAP kinas (Lewis et al., 1998; Errede et al., 1995; Gustin et al., 1998). O kinasách, které fosforylují MAP kinas na strukturně charakteristickém úseku, "aktivační smyčce", a tím je aktivují, se hovoří jako o MAP kinasách kinasách (MAP2K, MKK). O kinasách, které fosforylují a aktivují MAP2K jako o MAP kinasách kinasách kinasách (MAP3K, MEKK). Ty naopak mohou být aktivovány mnoha různými faktory. Substrátová specificita MAP2K a MAP3K je zpravidla úzce omezena pouze na několik málo kinas ve směru signalizace, což je ve shodě s jejich amplifikační a integrační signální funkcí (Seger et al., 1992; Crews et al., 1992). Životnost aktivované MAPK v cytoplasmě se obvykle pohybuje v řádech minut, jsou okamžitě rozpoznány pro modifikaci ubikvitinem a následnou

degradaci proteasomálním aparátem. V současné době jsou extenzivně popsány tři hlavní kaskády vedoucí k aktivaci MAPK kinas: ERK, c-Jun N-terminální kinasa (JNK/SAPK) a p38 α , které se účastní regulace komplexních buněčných dějů. Jsou významnou součástí signálních drah k embryogenesi, buněčné diferenciaci, proliferaci, genové expresi i apoptose v závislosti na vnějších podmínkách. Přehled hlavních MAP kinasových signálních cest je znázorněn na obr. 1.



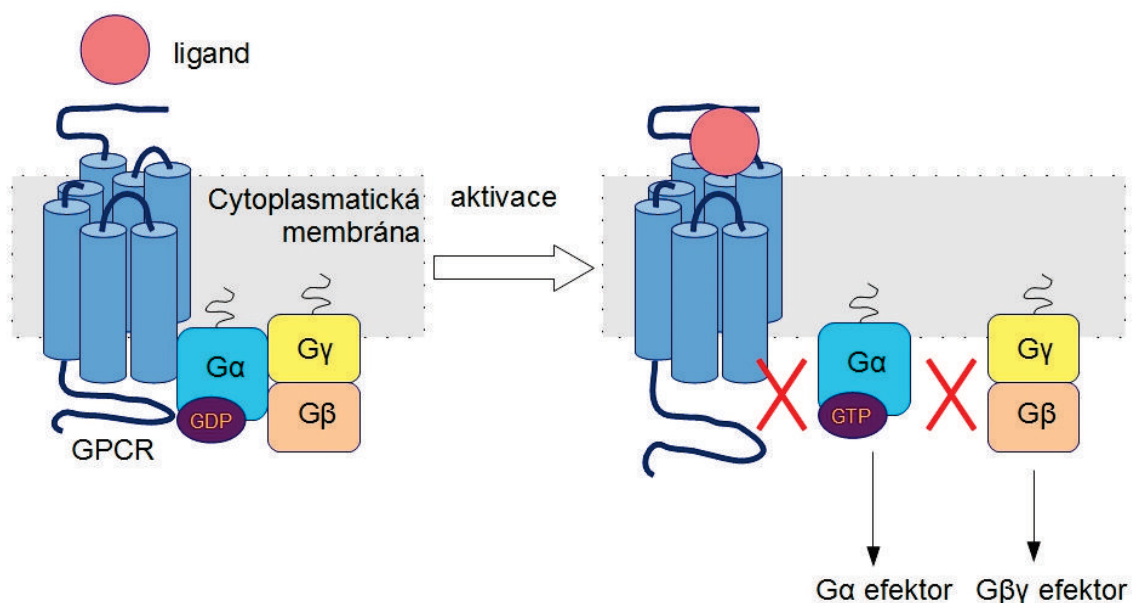
Obr. 1: Přehled hlavních MAPK signálních kaskád, jejich iniciátorů a buněčných dějů, které regulují. Proteinkinasa ASK1 patří do rodiny MAP3K, která zpravidla rozhoduje o iniciaci celé signální dráhy v závislosti na vnějších faktorech (podle Pearson et al., 2001).

2.2.2 G proteinová signalizace

G proteinová signalizace je významným modulátorem velkého počtu signálních drah, jež jsou klíčové v mnoha fyziologických procesech jako přenos nervového vzruchu, imunitní odpovědi, vnímání smyslů nebo kardiovaskulární funkce. Svoji podstatou má roli aktivátoru signalizace a ovlivňuje časový rámec i intenzitu přenášeného signálu. Skládá se z transmembránových receptorů spojených s G proteiny (GPCR), heterotrimerních G proteinů a signál-regulujících efektorů. Samotný G protein se skládá ze tří podjednotek označovaných G α , G β a G γ , přičemž podjednotka G α váže GDP (Evanko et al., 2001). Celý heterotrimer je zakotvený přes G α a G γ na vnitřní

straně membrány asociovaný s GPCR. Vazba $G\beta\gamma$ při tom snižuje spontánní disociaci GDP z $G\alpha$ (Brandt et al., 1985). Navázání ligandu (např. adrenalinu, noradrenalinu, histaminu, serotoninu, dopaminu i jiných) na specifický GPCR indukuje konformační změnu, což ústí v aktivaci G proteinu spolu s disociací GDP, místo něhož se okamžitě naváže GTP. Tato vazba přímo vede k rozpadu trimerního G proteinu na $GTP-G\alpha$ a $G\beta\gamma$, které se uvolní do cytoplasmatického prostoru. Obě podjednotky dále regulují aktivitu svých cílových efektorových proteinů, které přenáší signál přes druhé posly dále. Hydrolyza GTP má za následek opětovnou rekonstituci trimerního G proteinu a přerušování signalizace. Je tedy předpokládáno, že životnost komplexu $GTP-G\alpha$ přímo udává dobu, po kterou propaguje signál jak $GTP-G\alpha$, tak $G\beta\gamma$ (Ford et al., 1998). Standardní model G proteinové signalizace je uveden na obr. 2 (viz strana 20).

V souvislosti se signálními kaskádami je třeba zmínit i roli proteinů, které fungují jako molekulární "lešení", takzvané adaptorové proteiny. Tato různorodá skupina proteinů má za úkol koordinovat časovou a prostorovou souslednost signálních dějů. Udržují jednotlivé komponenty signální kaskády v těsné blízkosti, čímž vznikají makromolekulární komplexy zvané signalosomy, nebo je svojí vazbou udržují v blízkosti membrány či v určitém buněčném kompartmentu. Tímto způsobem mohou signální dráhy spolehlivě fungovat i v komplexním buněčném prostředí a udržovat přenos signálu bez nespécifických chyb (Good et al., 2011).



Obr. 2: Standardní model G proteinové signalizace. Po navázání ligandu (červeně) na obecný receptor spojený s G proteinem (GPCR, modře) dojde ke konformační změně v GPCR ústí v disociaci a rozpad komplexu trimerního G-proteinu složeného ze tří podjednotek $G\alpha$ (tyrkysově), $G\gamma$ (žlutě) a $G\beta$ (oranžově), které již separátně ovlivňují další efektorové elementy (adaptováno z McCudden et al., 2004).

2.3 Proteiny 14-3-3

Skupina proteinů 14-3-3 stojí v popředí vědeckého zájmu zejména díky velkému počtu biologických dějů, na jejichž kontrole se podílí. Je znám velký počet jejich vazebných partnerů. Naprostá většina interakcí je závislá na předchozí fosforylaci vazebného partnera. Jedná se o vysoce konzervované dimerní kyselé proteiny s relativní molekulovou hmotností okolo 30000. Jsou exprimované ve všech eukaryotických organismech, ve všech tkáních. Mají důležité regulační úlohy v proapoptických procesech, v progresi buněčném cyklu, signální transdukci, určování vnitro buněčné lokalizace, i v ovlivnění metabolických drah. Do současnosti bylo identifikováno 7 isoform savčího proteinu 14-3-3 (β , γ , ϵ , σ , ζ , τ , η), které vykazují známky redundantnosti a odlišné tkáňové distribuce, 15 isoform rostlinných homologů, a dvě isoformy 14-3-3 v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* popisované jako Bmh1 a Bmh2 (Rosenquist et al., 2001; Aitken et al., 1995; Ferl et al., 2002)

Poprvé byl 14-3-3 identifikován v roce 1965 při analýze mozkových proteinů. Jeho zvláštní název byl odvozen od pořadí jeho frakce po dvoudimenzionální DEAE-

celulosové chromatografii a charakteristických vlastností při migraci na škrobové elektroforéze (Moore et al., 1965)

Do současnosti bylo nalezeno přes 300 proteinů, které s proteinem 14-3-3 interagují. Mezi nejvýznamnější patří řada signálních kinas (PKC, ASK1, RAS, RAF a další) (Yaffe et al., 1997; Van Der Hoeven et al., 2000; Zhang et al., 1999), fosfatasy (Cdc25a, Conklin et al., 1995), modulátory G proteinové signalizace (fosducin, RGS3) (Benzing et al., 2000; Nakano et al., 2001), enzymy (tryptofanhydroxylasa, tyrosinhydroxilasa, serotonin-N-acetyltransferasa) (Ichimura et al., 1988; Ganguly et al., 2001), některé cytoskeletální faktory, regulátory buněčného cyklu, regulátory apoptosy (van Hemert et al., 2001). Díky tomu je pochopení interakcí proteinů 14-3-3 zásadní pro úplné porozumění regulačních molekulárních mechanismů biologických dějů, zejména regulace apoptosy, diferenciace a proliferace buněk, exprese genů, intracelulárního transportu, povrchové adhezi a tvoření cytoskeletální struktury (Gardino et al., 2006; Porter et al., 2006; Tzivion et al., 2006).

Interakce s vazebnými partnery 14-3-3 je často, ale ne ve všech případech (Aitken et al., 2002), zprostředkována fosforylací 14-3-3 vazebného motivu, která je zpravidla esenciální pro vznik vazby. Statistickou analýzou bylo zjištěno, že tato sekvence vykazuje vysokou míru podobnosti pro mnoho vazebných partnerů. S využitím peptidových knihoven byly potom nalezeny dva fosforylačně závislé vazebné motivy, které většina isoforem 14-3-3 rozpoznává: RSX(p)SXP a RXY(p)SXP, kde X označuje libovolnou aminokyselinu a (p)S fosforylovaný postranní řetězec serinu (Rittinger et al., 1999; Yaffe et al., 1997).

Strukturní funkce proteinu 14-3-3 se nejčastěji rozděluje na tři skupiny podle mechanismu regulace interagujícího proteinu:

A) Proteiny 14-3-3 mohou svojí vazbou měnit konformaci vazebného partnera. Ačkoliv je dimerní struktura 14-3-3 strukturně velice rigidní, je schopna vázat enormní množství různých proteinů. Bylo ukázáno, že pokud je interakční partner méně rigidní molekula, může vazba změnu jeho konformace indukovat s tím, že struktura 14-3-3 zůstane nezměněna (Yaffe et al., 2002). Jako příklad tohoto jevu lze uvést mechanismus regulace serotonin-N-acetyltransferasy (AANAT). V nefosforylovaném stavu vykazuje pouze nízkou katalytickou aktivitu díky malé afinitě k substrátu. Po fosforylaci a utvoření komplexu se 14-3-3 je však stabilizována katalytická část proteinu s vazebným místem pro substrát, což se odrazí na zvýšení aktivity více než desetkrát

a tedy aktivaci proteinu. (Ganguly et al., 2001; Obsil et al., 2001)

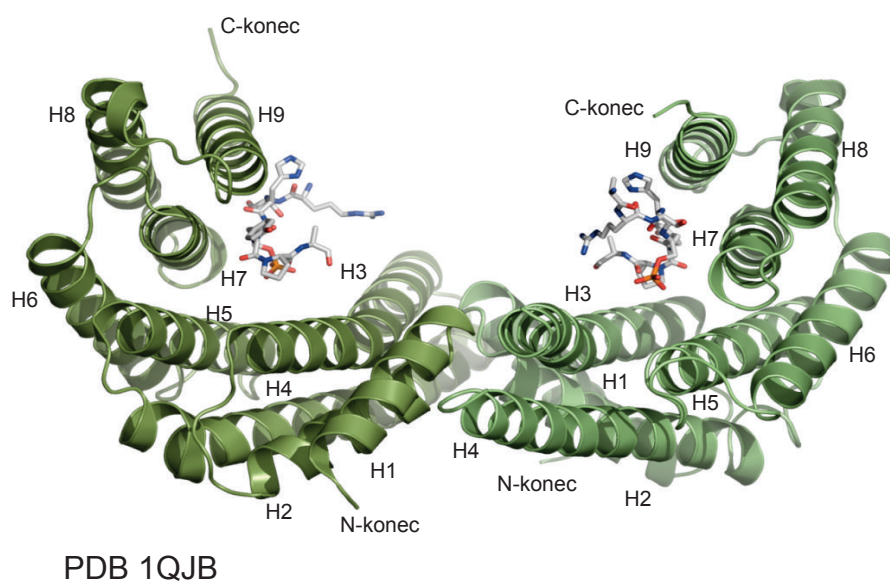
B) 14-3-3 může svojí vazbou blokovat kriticky důležité místa vazebného partnera a ovlivňovat tak jeho biologické funkce. Pro příklad této funkce, protein FOXO (z angl. Forkhead-box transcription factor O) mění svojí vnitro buněčnou lokalizaci cytoplasma/jádro v závislosti na maskování své jaderné signální sekvence pro transport. Blokaci sekvence zprostředkovává právě vazba proteinu 14-3-3 (Van Der Heide et al., 2004).

C) Adaptorové funkce. Bylo ukázáno, že 14-3-3 může vykazovat vlastnosti adaptorových molekul typických pro signální kaskády. Každá podjednotka dimeru 14-3-3 potom zpravidla interaguje s jiným proteinem a drží je ve vzájemné blízkosti dostatečně dlouhou dobu k aktivaci jejich biologické funkce. Tento mechanismus byl prokázán u enzymů glykogensyntetázy s proteinem tau (Agarwal-Mawal et al., 2003).

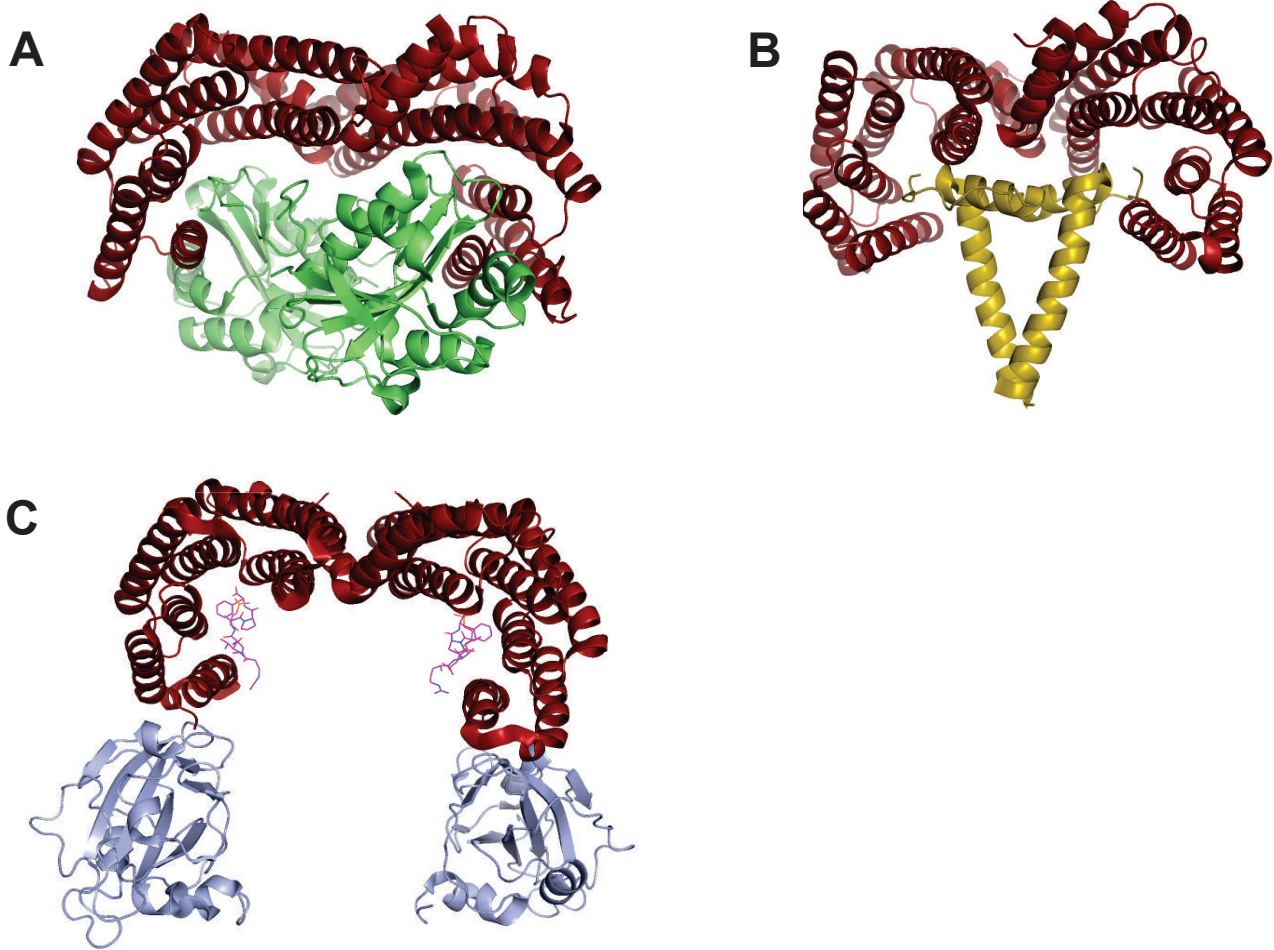
První krystalové struktury lidské 14-3-3 ζ (Liu et al., 1995) a 14-3-3 τ (Xiao et al., 1995) odhalily, že protein 14-3-3 tvoří dimerní komplex s vysokým obsahem α -helikální struktury. Každý monomer se skládá z devíti antiparalelních α -helixů, přičemž mezi helixy H3, H5, H7 a H9 je utvořena amfipatická kavita, do níž jsou soustředěny postranní řetězce aminokyselin z α -helixů. Celá dimerní molekula má charakteristický tvar písmene U s velkým centrálním značně nabitým kanálem obsahující dvě vazebná místa pro ligandy 14-3-3. Je tedy možná simultánní interakce se dvěma vazebnými motivy najednou, jež mohou náležet jednomu, ale i více vazebným partnerům viz. obr 3, strana 23 (Obsil et al., 2001; Rittinger et al., 1999; Yaffe et al., 1997). V současnosti jsou již známy struktury všech isoform 14-3-3. Jsou si navzájem strukturně velice podobné s i bez navázaného ligandu. Je mezi nimi ovšem významný rozdíl ve schopnosti tvořit homo nebo heterodimery v závislosti na struktuře dimerního rozhraní na helixech H3, H4 u jedné podjednotky a H1 a H2 u druhé (Yang et al., 2006). Ačkoliv je molekula značně konzervovaná a rigidní, její C-koncový segment je pravým opakem. Úsek za H9 nevykazuje žádné strukturní uspořádání, je tedy flexibilní a je v něm přítomna i vysoká variabilita primární struktury mezi různými isoformami. Při studiu interakcí bylo zjištěno, že po odstranění této části je vazebná afinita k substrátům zvýšena (Raf-1, protein BAD) (Truong et al., 2002). Bylo tedy navrženo, že C-koncový segment má na protein-proteinové interakce autoinhibiční vlastnosti, pravděpodobně brání vstupu nespécifického ligandu do vazebné kavity. Segment je před interakcí

orientován dovnitř vazebné kavity 14-3-3 a je odstraněn ven teprve po interakci s ligandem. Tento proces je zároveň narušen fosforylací threoninu na pozici 232 pro isoformu ζ , jenž brání navázání ligandu pravděpodobně snížením flexibility toho úseku 14-3-3 (Obsilova et al., 2004; Silhan et al., 2004). Kvasinkové verze 14-3-3, Bmh1 a Bmh2, mají na rozdíl od savčích isoform v C-koncovém segmentu přítomný polyglutaminový (17xQ) motiv, jehož funkce je neznámá. Jeho odstranění nemá na vazbu ligandu vliv a bylo jištěno, že není orientován k vazebným místům proteinu. Má tedy pravděpodobně jinou než autoinhibiční úlohu (van Heusden and Steensma et al., 2006; Veisova et al., 2010).

Ačkoliv je struktura 14-3-3 dobře známá i v komplexech s krátkými peptidy, struktury 14-3-3 v komplexu s vazebným partnerem stále zůstávají velikou výzvou viz obr. 4, strana 24. Dosud byly vyřešeny pouze tři, což je v porovnání s více než 300 vazebnými partnery zanedbatelný počet (Obsil et al., 2001; Ottmann et al., 2007; Taoka et al., 2011).



Obr. 3: Krystalová struktura dimeru 14-3-3 s peptidem navázaným uvnitř vazebné kavity (Ritiger et al., 1999)



Obr. 4: Známé krystalové struktury komplexů proteinu 14-3-3 (červěně) s AA-NAT (A, zeleně, PDB 11B1, Obsil et al., 2001), s H⁺-ATPasou (B, žlutě, PDB 2O98, Ottmann et al., 2007) a s proteiny Hd3a/OsFD1/GF14c (C, modře, PDB 3AXY, Taoka et. al., 2011). V prvních dvou případech je interakční partner proteinu 14-3-3 ukotven ve vazebné kavitě, v posledním interaguje přes vnější region.

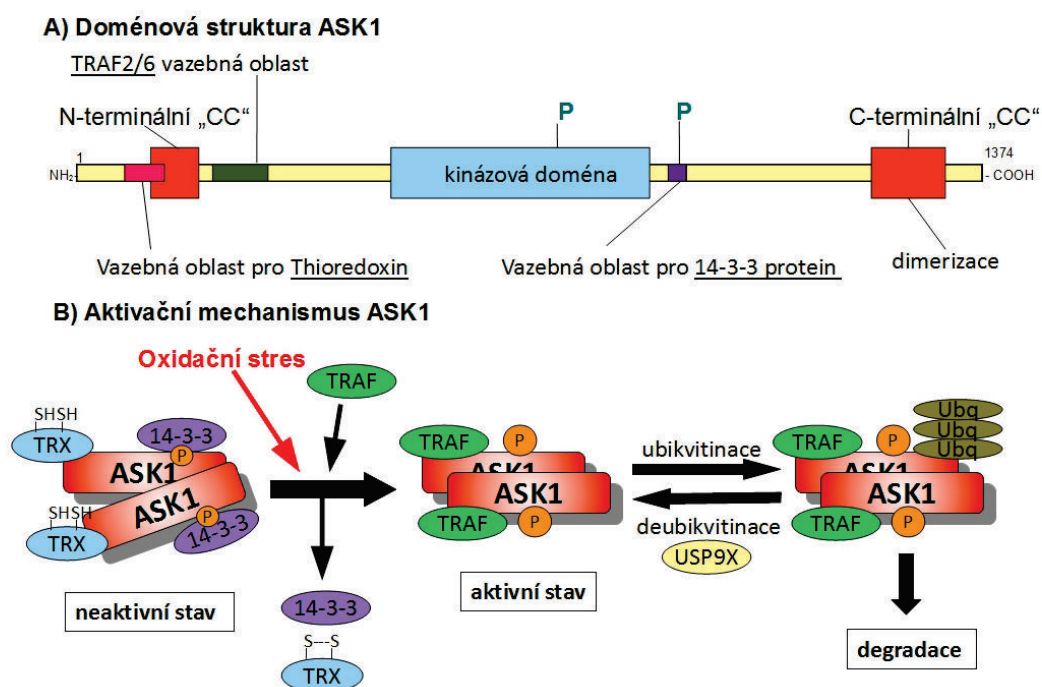
2.4 Regulace enzymové aktivity ASK1

2.4.1 ASK1

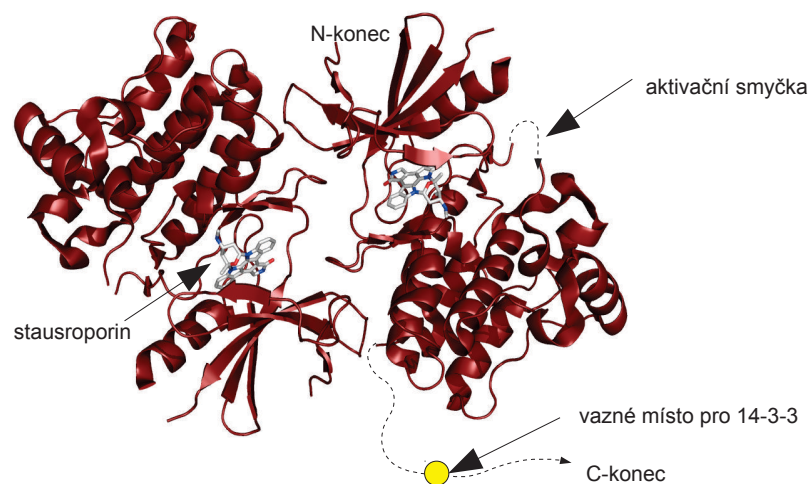
ASK1 (z anglického Apoptosis signal-regulating kinase, MAP3K5) je důležitým členem MAP3K proteinkinasové rodiny (Takeda et al., 2004). V odpověď na různé stresové podněty působící na buňku včetně oxidačního stresu, expozice ultrafialovému záření, stresu endoplasmatického retikula, skokového zvýšení koncentrace vápenatých iontů nebo vnějším podnětům imunitního systému, se spolupodílí na iniciaci signální kaskády vedoucí k aktivaci MAP kinas JNK a p38. Jejimi přímými substráty jsou MAP2K4/7 a MAP2K3/6. MAP kinasy dále spouští procesy vedoucí k apoptose přes caspasu 3 a 9, ale v závislosti na typu buňky či kontextu v buněčné signalizaci mohou podpořit i proliferaci nebo diferenciaci buňky. (Saitoh et al., 1998; Nishitoh et al., 2002; Takeda et al., 2004). ASK1 má velký význam v rozvoji závažných neurodegenerativních a kardiovaskulárních chorob stejně tak jako v rozvoji rakoviny. Je proto považována za slibný cíl terapeutického zásahu (Karawazaki et al., 2014).

Lidská ASK1 se skládá z 1374 aminokyselin s charakteristickou serin/threoninovou kinasovou doménou uprostřed molekuly. Na N i C-konci jsou dále přítomny dvě domény obsahující "coil-coiled" (CC) strukturní motiv, jenž je odpovědný za homo-oligomerizaci proteinu (Tobiome et al., 2002, Bunkoczi et al., 2007, viz obr. 5, strana 26). Za fyziologických podmínek ASK1 tvoří homooligomer přímou interakcí mezi C-koncovými CC doménami. Interaguje rovněž s několika dalšími proteiny včetně thioredoxinu 1 (TRX1) a proteinem 14-3-3 za tvorby nekompletně charakterizovaného vysokomolekulárního komplexu – ASK1 signalosomu (Saitoh et al., 1998; Noguchi et al., 2005; Zhang et al., 1999). Jak TRX1 tak protein 14-3-3 jsou přirozenými inhibitory ASK1 enzymové aktivity. V podmínkách oxidačního stresu však z ASK1 disociují nejasným mechanismem, což má za následek homo-oligomerizaci ASK1 i přes N-koncovou CC a navázání TRAF2/6 (faktor asociovaný s receptorem pro tumor-nekrotizující faktor α) opět na N-terminální region ASK1. Tyto reakce akcelerují rychlost autofosforylace kinasové domény na threoninu 838, jenž leží na charakteristické aktivační smyčce proteinu, a nakonec ústí v plnou aktivaci ASK1 (Fujino et al., 2007; Liu et al., 2000, viz obr. 5, strana 26)

ASK1 nebyla strukturně plně charakterizována, je znám pouze přibližný výskyt domén. Výjimku tvoří kinasová doména, která byla vykrytalizována separátně s širokospektrálním inhibítorem kinas staurosporinem jako dimer (viz obr. 6, strana 27). Její prostorová struktura je velice podobná struktuře kinasových domén ostatních MAP kinas, ačkoliv má pouze malou homologii primární struktury (29% sekvenční identita s PAK1 kinasou, která je považována za její nejbližší známý příbuzný protein, Bunkoczi et al., 2007). Její N-koncová a C-koncová část kromě CC domén postrádá jakoukoliv homologii ke známému strukturně charakterizovanému proteinu.



Obr. 5: A) Znárodnění doménové struktury ASK1. ASK1 obsahuje thioredoxin-vazebný region mezi 46. až 322. aminokyselinou (fialově), potom následuje N-terminální CC doména (červeně), dále oblast, na kterou se váže faktor TRAF (zeleně). 670. aminokyselinou začíná kinasová doména (modře), končí na pozici 940, přičemž region před ní vykazuje dle predikce známky sekundární struktury. Těsně na ní navazuje vazebné místo pro 14-3-3 se serinem 967, který podléhá fosforylaci. Úsek až po C-koncovou CC doménu (1236 - 1293) se dle predikcí sekundární struktury PSIPRED jeví jako nestrukturovaný. B) Navržený aktivační mechanismus ASK1 v podmínkách oxidačního stresu. (podle Ichijo et al., 1997)



PDB 2CLQ

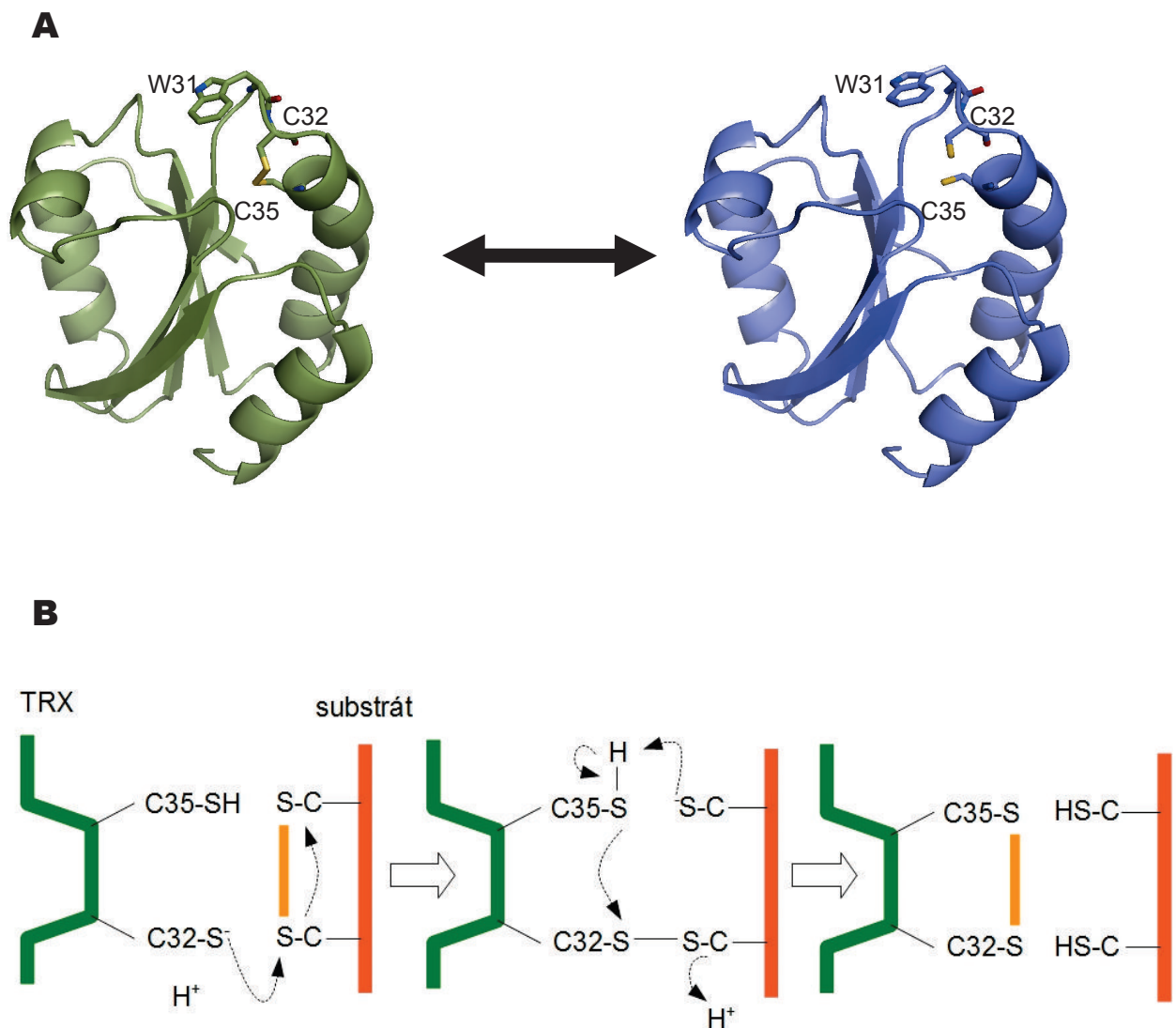
Obr. 6: Krystalová struktura dimerní kinasové domény ASK1 v komplexu se stauroporinem (PDB 2CLQ). U úseků hlavního řetězce, které ve struktuře nebyly jasně definovány (aktivační smyčka kinasy), je znázorněn jejich hypotetický průběh čárkovaně. Stejně tak C-koncový segment se 14-3-3 vazebným místem, jež ve struktuře není zahrnuto, je znázorněno stejným způsobem. Strukturální prvky jsou popsány pouze na jednom z monomerů. (Bunkoczi et al., 2007)

2.4.2 Interakce ASK1 s TRX1

Thioredoxiny (TRX) jsou malé dithioloxidoreduktasové enzymy, jež se všudypřítomně vyskytují napříč živými organismy od bakterií po savce. Mají důležité biologické funkce jako redukce disulfidových vazeb v redukujícím prostředí celulárních kompartmentů, přísun redukčních ekvivalentů redukujícím enzymům a regulace několika transkripčních faktorů a proteinů buď prostřednictvím přímé redukce cysteinů nebo jinými mechanismy (shrnuto v Powis et al., 2001). Jsou známy 2 isoformy TRX 1 a 2. Zatímco TRX1 se vyskytuje dominantně v cytoplasmě a dalších kompartmentech vyžadujících redukční prostředí, TRX2 je lokalizován především v mitochondriích, kde se účastní kromě udržování oxidoredukční rovnováhy i na regulaci membránového potenciálu. Molekula TRX se skládá z pěti β -skládaných listů tvořících kompaktní hydrofobní jádro proteinu obklopené čtyřmi α -helixy. Vysoce konzervovaný katalytický motiv $^{31}WCGPC^{35}$ spojuje druhý β -skládaný list s druhým α -helixem. Právě dva cysteiny 32 a 35, jež katalytický motiv obsahuje v lidské formě TRX1, jsou zodpovědné za

katalytickou aktivitu, jejíž mechanismus je uveden na obr. 7B, strana 29 (Holgren et al., 1975). Krystalové struktury TRX1 v oxidovaném i redukovaném stavu jsou dostupné a ukazují, že disulfidový můstek mezi cysteiny 32 a 35 má pouze minimální vliv na strukturu celého proteinu zahrnující výrazněji akorát změnu konformace tryptofanu 31 (Weichsel et al., 1996; viz obr. 7A, strana 29)

TRX1 interaguje s ASK1 na oblasti mezi 46. a 277. aminokyselinou. Je při tom předpokládáno, že tímto způsobem je blokována homo-oligomerizace N-terminálního CC motivu (Takeda et al., 2009; Fujino et al., 2007). Cystein na 250. pozici v aminokyselinové sekvenci ASK1 má rovněž zásadní důležitost pro zahájení signalizace tímto proteinem jakožto odpovědi na oxidační stres v buňce a pravděpodobně se přímo podílí na interakci s TRX1 (Zhang et al., 2004, Nadeau et al., 2009). Přesný strukturní mechanismus interakce TRX1 a ASK1 je stejně tak jako mechanismus jejich disociace neznámý díky absenci strukturních dat TRX-vazebné domény ASK1. Bylo navrženo, že za podmínek oxidačního stresu v buňce je TRX1 oxidován na cysteinech 32 a 35 katalytického motivu a že se mezi nimi vytváří disulfidová vazba. Ta má komplex destabilizovat a umožnit tím aktivaci ASK1 (Liu et al., 2002). Není však jasné, zdali je vazba TRX1 na ASK1 zprostředkována pouze slabými nekovalentními interakcemi nebo jestli se za fyziologického stavu vytváří mezimolekulární disulfidová vazba. Druhá možnost byla zmíněna v práci od Nadeau et al. (Nadeau et al., 2007, Nadeau et al., 2009). Tam byl navržen odlišný mechanismus aktivace ASK1. Autoři uvažují, že oxidační stres zapříčiní tvorbu mezimolekulárních disulfidových vazeb mezi samotnými N-koncovými částmi v dimeru ASK1, což je prý kritický prvek pro aktivaci samotné kinasy. Interakce TRX1 a ASK1 je z jejich pohledu též způsobena mezimolekulární vazbou mezi oběma proteiny. Inhibiční efekt TRX je potom důsledek jeho dithiolreduktasové aktivity, protože pouze oxidovaný oligomerní stav N-koncové části ASK1 by měl udržovat kinasu plně aktivní.



Obr. 7: A) Krystalové struktury TRX oxidované (modře, PDB 1ERV) a redukované (zeleně, PDB 1ERU) formy. Z porovnání obou modelů lze vyčíst, že konformace po oxidaci se téměř nezmění, jediná aminokyselina vykazující mírnou změnu je tryptofan 31 (podle Weischel et. al., 1996). B) Katalytický mechanismus TRX. Díky efektu lokálního pH se cystein 32 vyskytuje dominantně v hydrolyzované podobě, která může provést nukleofilní substituci na cystein v disulfidové vazbě náležící substrátu. Následné přeuspořádání vyústí v tvorbu redukovaných cysteinů na substrátu a disulfidové vazby mezi cysteiny 32 a 35 na TRX1. TRX1 je dále regenerovaný enzymem thioredoxin reduktasou (podle Holgren et al., 1995).

2.4.3 Interakce ASK1 a proteinu 14-3-3

Vedle inhibičního efektu TRX1 byl popsán i další inhibiční mechanismus ASK1 závislý na reverzibilní fosforylaci na serinech 83, 967, 1034, přičemž u serinu 967 byla

ukázána přímá spojitost s vazbou proteinu 14-3-3 za podmínek oxidačního stres (Fujii et al., 2004; Goldman et al., 2004; Zhang et al., 1999; Kim et al., 2001). Typické vazebné místo pro 14-3-3 RSI⁹⁶⁷SLP se nachází v sekvenci ASK1 těsně za katalytickou kinasovou doménou a bylo ukázáno, že v buňkách nevystavených oxidačnímu stresu, je na neaktivním enzymu plně fosforylované a proteinem 14-3-3 obsazené. Vazba preferenčně nezávisí na isoformě 14-3-3, jsou však přítomné jisté rozdíly ve vazebné afinitě (Subramanian et al., 2004). Fosforylace vazebného motivu je provedena specifickou (avšak do současnosti neznámou) kinasou, za defosforylaci motivu je však zodpovědná fosfatasa kalcineurin, jež je pravděpodobně důležitý spojovací a integrační článek mezi touto MAP kinasovou kaskádou a ostatními proapoptotickými pochody (Liu et al., 2006). Defosforylace vazebného místa pro 14-3-3 totiž logicky vede k disociaci tohoto proteinu z komplexu a aktivaci ASK1. Tomuto procesu procesu mají napomáhat i další faktory interagující s ASK1 AIP1 a RIP1 (Zhang et al., 2003; Zhang et al., 2007)

Ačkoliv je interakce mezi ASK1 a 14-3-3 dlouho prokázaným důležitým elementem regulace apoptosy, molekulární mechanismus jakým se tak děje je paradoxně naprosto neznámý. Vzhledem k početným vzorcům působení proteinu 14-3-3 a poloze vazebného místa na ASK1 bylo navrženo, že 14-3-3 ovlivňuje přímo katalytickou doménu ASK1, ale též byla pozorována změna vnitro buněčné distribuce (Hwang et al., 2002; Subramanian et al., 2004)

2.5 Fosducin

Správná regulace G proteinové signalizace je kritická pro správné řízení všech buněčných dějů. Protein fosducin je jedním z účastníků této regulace interagující s G $\beta\gamma$ podjednotku vzniklou rozpadem G proteinu. Po vazbě vytváří stabilní komplex a brání tak opětovné reasociaci G $\beta\gamma$ s podjednotkou G α . Tím tedy brání i následným krokům v signální kaskádě, které jsou na G $\beta\gamma$ závislé. Jedná se o příklad negativní regulace – utlumování signální odpovědi na vnější stimul. (Bauer et al., 1992; Lee et al., 1987).

Fosducin byl identifikován poprvé v tkáních oční sítnice jakožto protein s výraznou fosforylační post-translační modifikací. Přesněji bylo zjištěno, že se ve vysokých koncentracích nachází v savčích fotoreceptorech, které jsou hustě rozseté na povrchu sítnic, a rovněž i v evolučně příbuzné mozkové šišince, kde je jeho funkce

neznámá. V jiných tkáních se nachází pouze v nízkých koncentracích (Danner et al., 1996; Lee et al., 1990b; Lee et al., 1987).

Fosducin byl vykrystalizován v komplexu s $G\beta\gamma$ podjednotkou G proteinu transducinu ($G_i\beta\gamma$) a jeho struktura vyřešena rentgenostrukturní analýzou. Skládá se ze dvou domén obklopující $G_i\beta\gamma$ ze dvou stran, přičemž domény se navzájem neovlivňují (viz obr. 8, Gaudet et al., 1996; Loew et al., 1998). C-koncová doména fosducinu má strukturní homologii k thioredoxinu. Jedná se o globulární část proteinu interagující s tou částí povrchu $G_i\beta\gamma$, jež vykazuje vazbu na vnitřní stranu cytoplasmatické membrány ($G_i\beta\gamma$ v krystalové struktuře byl rozpustný nemembránový mutant, viz obr. 8, strana 33). N-koncová doména se váže na $G_i\beta\gamma$ v oblasti, která je zodpovědná za vazbu $G_i\alpha$, a pravděpodobně tak stéricky brání zpětné asociaci $G_i\beta\gamma$ s $G_i\alpha$ po hydrolýze GTP. Ačkoliv ve struktuře krystalu má tato část definovanou strukturu, je pravděpodobně strukturovaná pouze z části s elementy α -helikálních struktur. Měření CD spektroskopii a NMR samotného fosducinu v roztoku totiž ukazují, že je v nevázaném stavu vysoce flexibilní a nestrukturovaná. Fosducin lze tedy považovat za částečně nestrukturovaný protein, který se stane plně strukturovaným teprve po vazbě na jiný protein (Gaudet et al., 1999).

Úloha fosducinu byla nejlépe charakterizována v souvislosti s biochemií zraku, transformací světla na intracelulární signál, jeho přenosem přes membránu a stimulací odpovědi nervové sítě. Jedná se o jednu z nejlépe charakterizovaných G proteinových signálních drah. Světelný signál, foton zachycený povrchovým transmembránovým receptorem rhodopsinem (GPCR), indukuje izomerizaci jeho kofaktoru 11-*cis*-retinalu na 11-*trans*-retinal. Tato změna rhodopsin aktivuje, pravděpodobně dochází ke změně konformace, což vede k disociaci komplexu G proteinu transducinu ($G_i\alpha\beta\gamma$) a výměně GDP na $G_i\alpha$ za GTP. $G_i\alpha$ -GTP poté aktivuje cGMP fosfodiesterasu štěpící cyklickou formu GMP, jež v buňce slouží jako "druhý posel". Snížení koncentrace cGMP pod kritickou úroveň vede k uzavření cGMP dependentních transmembránových kationtových kanálů. To dále způsobí snížení koncentrace vápenatých kationů v cytoplasmě, hyperpolarizaci cytoplasmatické membrány fotoreceptoru a následně aktivaci nervového vzruchu.

Ve fotoreceptoru přizpůsobeném na tmu je potřeba pouze jednoho fotonu k degradaci přibližně sta tisíce molekul cGMP, což je více než dostatečně silný stimul k aktivaci nervové dráhy. Při plném osvětlení je však tato odpověď příliš silná, protože

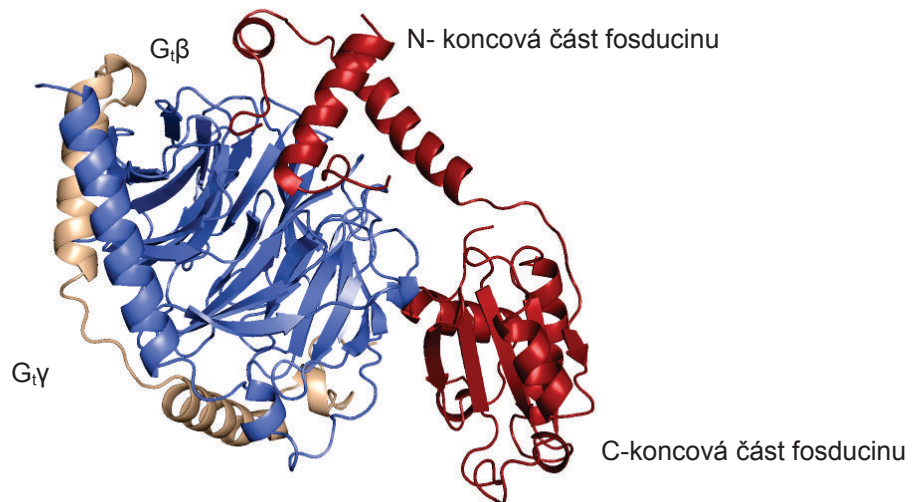
fotonů je veliké množství, a touto mírou amplifikace by vedla k totálnímu zahlcení a vyčerpání signálních kapacit. V buňce jsou tedy přítomné mechanismy, které amplifikaci světelného signálu dokáží regulovat na přijatelnou úroveň (světelná adaptace). Může se jednat buď o okamžitou adaptaci založenou na inaktivaci rhodopsinu přes rhodopsinkinasu a protein arrestin nebo adaptaci dlouhodobou jejíž součástí je i fosducin (Hargrave et al., 1992; Lolley et al., 1990; Wilkins et al., 1996). V případě savčích fotoreceptorů bylo ukázáno, že vysoká koncentrace fosducinu je přibližně stejně velká jako koncentrace transducinu (Lee et al., 1990c). Pokud jsou přizpůsobené světlu, fosducin váže s vysokou afinitou komplex $G_i\beta\gamma$, čímž omezuje kaskádovitou signalizaci, neboť nedochází k reasociaci s $G_i\alpha$. Byla též popsána korelace fosforylace fosducinu a mírou světelné adaptace. Při adaptaci na tmu se fosducin nachází ve fosforylované formě a na $G_i\beta\gamma$ se neváže, odštěpení fosfátů a vazba podjednotky transducinu je provedeno jako odpověď na změnu osvětlení (viz. obr. 9, strana 34, Lee et al., 1984).

Jak bylo popsáno výše, při přenosu světelného signálu za světla je uzavření cGMP-dependentních kationtových kanálů spojeno s následným snížením koncentrace vápenatých iontů v cytoplasmě. To však zároveň s hyperpolarizací způsobuje snížení aktivity adenyllylcyklasy, která produkuje cAMP (další z kategorie "druhých poslů"). Koncentrace cAMP v cytoplasmě je tedy snížena, což přímo vede k deaktivaci proteinkinasy A (cAMP-dependentní proteinkinasa, PKA) a jako důsledek se tedy hromadí její substráty v nefosforylovaném stavu, z nichž jeden je i fosducin silně vázající $G_i\beta\gamma$. Za nedostatku světla naopak koncentrace koncentrace cGMP a cAMP vzrůstá a tedy roste i míra fosforylace fosducinu, který se ve fosforylované podobě na $G_i\beta\gamma$ neváže a umožní tak tedy maximální amplifikaci signálu (Willardson et al., 1996).

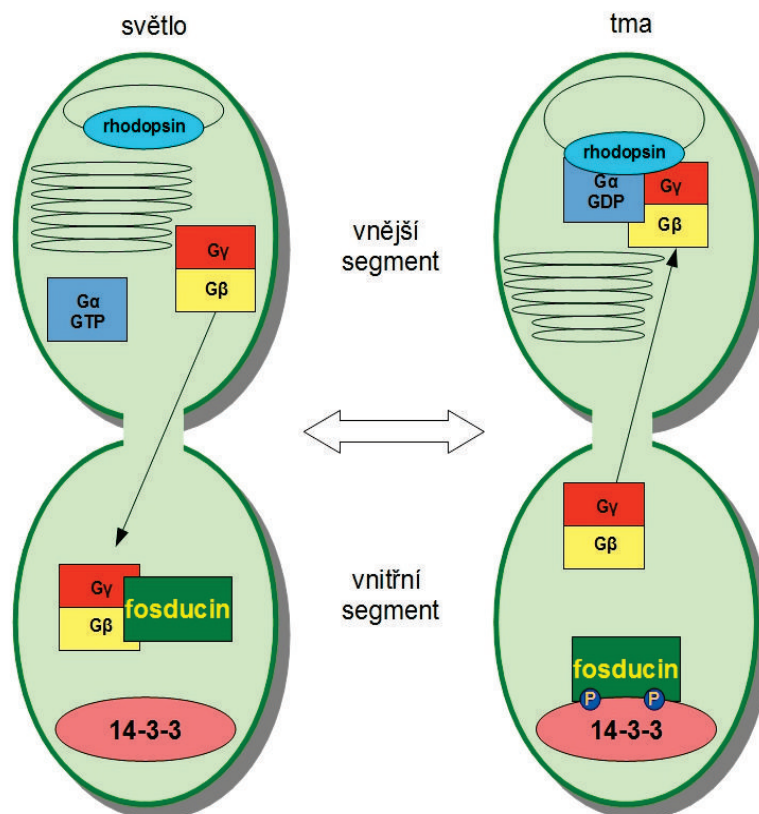
PKA může fosducin fosforylovat na serinu 73 (podle aminokyselinové sekvence lidského fosducinu). Bylo zjištěno, že další kinasa Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní kinasa II (CaMKII) je schopna fosducin fosforylovat na dalších serinech 6, 36, 54 a 73 (Lee et al., 1990a; Thulin et al., 2001). Bylo ovšem ukázáno, že pro regulační funkci signalizace (blokace vazby $G_i\beta\gamma$ a fosducinu) jsou kritické pouze fosforylace na zbytecích 54 a 73. Při *in vitro* experimentech však s $G_i\beta\gamma$ interagovaly jak fosforylované tak nefosforylované formy fosducinu, což přineslo rozpor s *in vivo* pozorováním biologických funkcí. Následně bylo zjištěno, že fosducin s fosforylacemi na serinech 54 a 73 interaguje s proteiny 14-3-3, což rozpor v pozorováních vysvětlilo. Protein 14-3-3 navázaný na dvojnásobně fosforylovaný fosducin totiž účinně blokuje asociaci

fosducinu s $G_i\beta\gamma$ (Nakano et al., 2001; Thulin et al., 2001). Mechanismus jakým se tak děje byl na základě fluorescenčních experimentů vysvětlen tak, že vazba 14-3-3 indukuje jak v N-terminální části fosducinu, kde se seriny 54 a 73 nachází, tak i v C-terminální části konformační změny v místech důležitých pro vazbu s $G_i\beta\gamma$. Protein 14-3-3 rovněž vazbu stéricky blokuje (Rezabkova et al., 2012).

Kromě ovlivnění reasociace $G_i\beta\gamma$ s $G_i\alpha$ hraje fosducin důležitou úlohu i ve vnitrobuněčné lokalizaci $G_i\beta\gamma$. Nedisociovaný komplex transducinu $G_i\alpha\beta\gamma$, je lokalizován zejména na vnějším segmentu fotoreceptorů. Pokud je zachytáván světelný signál, disociovaná $G_i\beta\gamma$ interaguje s nefosforylovaným fosducinem, což kromě blokování zpětné asociace s $G_i\alpha$ zahájí také translokaci tohoto komplexu do vnitřního segmentu fosforeceptorové buňky. Pokud nastane tma, je ve vnitřním segmentu fosducin fosforylován a kontinuálně vázán proteinem 14-3-3. Volná $G_i\beta\gamma$ se opět přesovává do vnějšího segmentu, kde se napojí na zbývající podjednotky transducinu (viz. obr. 9, strana 34, Lee et al., 2004).



Obr. 8: Krystalová struktura trimerního komplexu fosducinu (červeně) s $G_i\beta$ (modře) a $G_i\gamma$ (žlutě). (PDB 1A0R, podle Gaudet et al., 1996).



Obr. 9: Model regulace transducinu ve fotoreceptorové buňce. Při osvětlení (vlevo) se na G $\beta\gamma$ odpojené od G α a diskové membrány váže nefosforylovaný fosducin, který zahájí translokaci G $\beta\gamma$ do vnitřního segmentu fotoreceptoru, čímž brání v opětovné reasociaci s G α . Za tmy (vpravo) je fosducin fosforylován, dochází k vazbě na 14-3-3 a blokování interakce s G $\beta\gamma$. Ta je transportována zpět do vnějšího segmentu, naváže G α a reasociuje s rhodopsinem v diskové membráně. (podle Lee et al., 2004)

2.6 Neutrální trehalasa

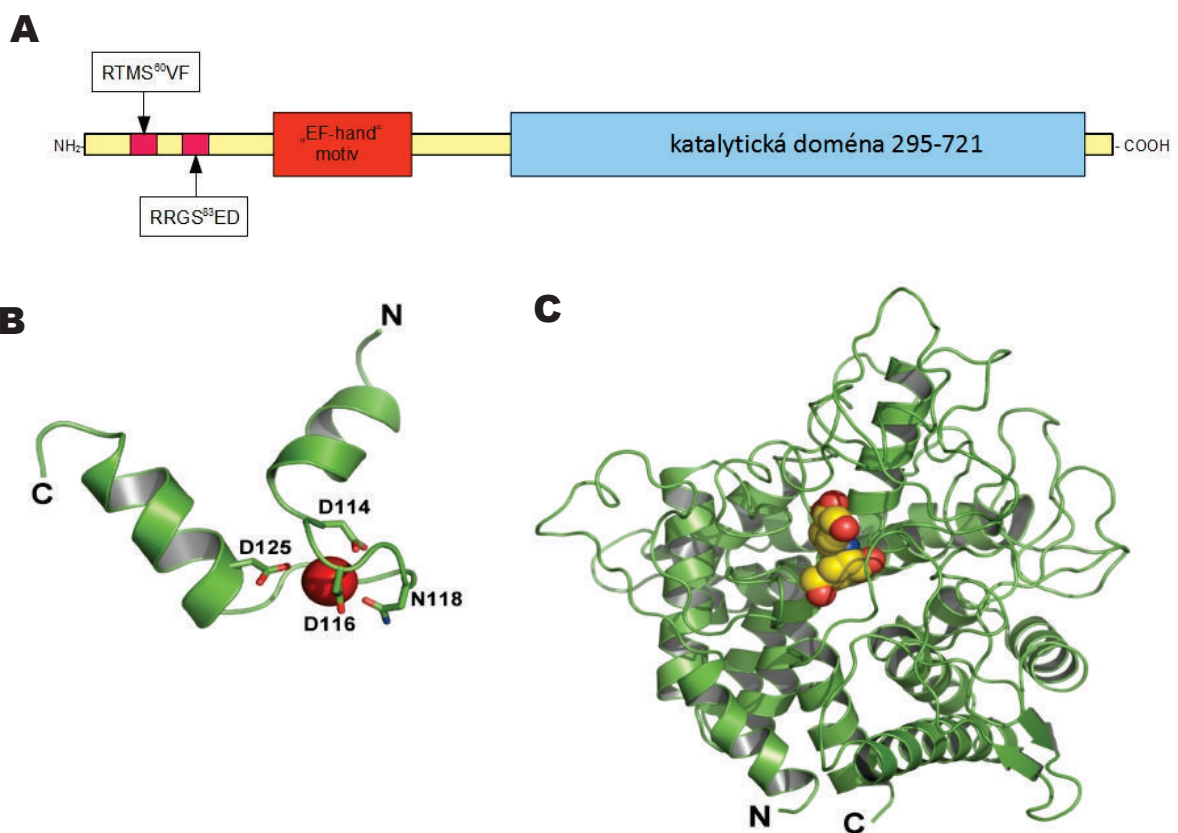
Neutrální trehalasa (Nth) patří do enzymové skupiny glykosylhydrolas (EC 3.2.1.28), jež je podskupinou obecných O-glykosylhydrolas (EC 3.2.1) zahrnující všechny enzymy s trehalasovou aktivitou. Trehalasa hydrolyzuje disacharid trehalosu (α -D-glukopyranosyl-(1-1)- α -D-glukopyranosid) na dvě molekuly glukosy a kontroluje tak její koncentraci (App et al., 1989; Kopp et al., 1993). Poprvé byla objevena a popsána v buňkách kvasinek *Aspergillus niger* a *Saccharomyces cerevisiae*, později však byla identifikována v širokém spektru živých organismů od bakterií, kvasinek a hub ke hmyzu a rostlinám. V savčích buňkách je však její výskyt minimální, u člověka je její výskyt omezen na membrány ledvin a střev avšak s nejasnou funkcí. (Yonemaya et al., 1987; Ruf et al., 1990).

Trehalosa je přirozeně se vyskytující hojný neredukující disacharid, který má funkci jako zásobní cukr, což je významné zejména u hmyzu, kde trehalosa slouží jako hlavní zdroj energie pro let (Becker et al., 1996). Též je to metabolit odbourávaný za stresových podmínek. Jeho koncentrace vzrůstá v závislosti na vnějších podmínkách například při dehydrataci, přehřátí, chladu, oxidačním stresu nebo vysušení. To naznačuje, že tato molekula pravděpodobně slouží i jako ochranný prvek pro proteiny a membrány před poškozením v důsledku stresových podmínek. U kvasinek a rostlin může též sloužit jako signální molekula regulující trehalosový metabolismus, transport glukosy nebo míru růstu (Elbein et al., 2003).

Nejrozšířenější a nejlépe popsána biosyntetická cesta pro trehalosu zahrnuje enzym trehalosfosfátsyntasa (TPS), který produkuje trehalosu-6-fosfát (trehalosu-6-P) tím, že katalyzuje přenos glukosy z UDP-glukosy na glukosu-6-fosfát za vzniku trehalosu-6-P a UDP (Cabib et al., 1958). Na rozdíl od ostatních organismů, kde TPS pracuje jako monomer, u *Saccharomyces cerevisiae* se vyskytuje jako komplex 4 podjednotek, z nichž dvě jsou pravděpodobně katalytické a dvě neaktivní regulační. Podle tohoto zjištění bylo navrženo, že by se mohlo jednat o zásadní regulační prvek trehalosového a glukosového metabolismu u kvasinek (Noubhani et al., 2000). Trehalosa-6-P je dále přeměňována na trehalosu pomocí trehalosa-6-P fosfatasy.

Bylo ukázáno, že v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* se vyskytuje několik trehalas: vakuolární kyselá trehalasa Ath1 s pH optimem okolo 4,5 a dále cytoplasmatické neutrální trehalasy Nth1 a Nth2 s pH optimem 7. Z analýzy a mezidruhového porovnání aminokyselinové sekvence u jedné z nich, Nth1, vyplynulo, že v *Saccharomyces cerevisiae* a v *Kluyveromyces lactis* (Nwaka et al., 1995; Amaral et al., 1997) mají na N-terminálním konci řetězce oproti jiným organismům navíc jisté prodloužení, které nese několik fosforylačních míst pro PKA a taky charakteristický motiv vázající vápenaté ionty označovaný jako "EF-hand like". Tyto strukturální prvky napovídají, že se jedná o možné regulační úseky ovlivňující enzymovou aktivitu (Uno et al., 1983; Ortiz et al., 1983; Franco et al., 2003). Následně bylo skutečně prokázáno, že minimálně v případě *Saccharomyces cerevisiae* je aktivita Nth1 regulována fosforylací PKA, koncentrací vápenatých ionů a vazbou proteinu 14-3-3, tedy jejich kvasničnými analogy Bmh1 a Bmh2 (Panni et al., 2008; Veisova et al., 2012; Schepers et al., 2012)

V N-terminálním segmentu kvasničné Nth1 byly identifikovány dvě klíčová fosforylační místa, která jsou zodpovědná za aktivaci enzymu za přispění proteinů 14-3-3 (viz obr. 10). Tento mechanismus aktivace je daleko výkonnější v porovnání s mechanismem založeným pouze na zvýšení vápenatých kationtů přítomným u jiných organismů (Veisova et al., 2012). Bylo rovněž ukázáno, že na strukturní úrovni vazba proteinu 14-3-3 ovlivňuje konformaci jak "EF-Hand" motivu tak i katalytické domény Nth1, což naznačuje, že tyto regiony mají důležitou, avšak v současnosti nejasnou úlohu v aktivaci Nth1 *Saccharomyces cerevisiae* (Macakova et al., 2013)



Obr. 10: A) Doménová struktura Nth1 ze *Saccharomyces Cerevisiae*. Flexibilní N-terminální konec nese dvě vazebná místa pro protein 14-3-3 (fialově), následuje vápník vázající charakteristický motiv "EF-hand" (červeně) a potom samotná katalitická doména (295-721, modře). B) Homologní model "EF-hand" motivu Nth1 na základě struktury stejného motivu v kalmodulinu. Postranní řetězce důležité pro vazbu vápníkového iontu jsou zobrazeny červeně. C) Homologní model katalytické domény Nth1 na základě struktury trehalasy Tre37A z *Escherichia Coli*. Aktivní místo obsahuje inhibitor validoxyamine (přejato Macakova et al., 2013, Kopecka et. al., 2014)

3. Cíle práce

1. Biofyzikální a strukturní analýza komplexů signální proteinkinasy ASK1 s jejími fyziologickými inhibitory TRX1 a protein 14-3-3:

- Komplex thioredoxin-vazebné domény ASK1 (ASK1-TBD) s TRX1
 - Biofyzikální charakterizace proteinového komplexu ASK1-TBD:TRX1
 - Lokalizace interakčních oblastí a možnosti indukované změny jejich konformace
 - Vyřešení struktury komplexu s nízkým rozlišením
 - Návrh možného mechanismu inhibice ASK1 prostřednictvím TRX1
- Komplex katalytické domény ASK1 (ASK1-CD) s proteinem 14-3-3
 - Biofyzikální charakterizace proteinového komplexu ASK1-CD:14-3-3
 - Vyřešení struktury komplexu s nízkým rozlišením

2. Studium interakcí proteinu 14-3-3 s jednotlivými doménami fosducinu:

- Biofyzikální charakterizace separovaných koncových domén fosducinu
- Posouzení vlivu jednotlivých domén fosducinu na vazbu proteinu 14-3-3

3. Studium vlivu vápenatých kationů na interakci mezi neutrální trehalasou 1 a Bmh1

- Posouzení stability komplexu Bmh1 s neutrální trehalasou 1 v přítomnosti a nepřítomnosti vápenatých kationů

4. Materiál a metody

4.1 Přehled použitého materiálu a přístrojů

4.1.1 Chemikálie

Agar - Carl Roth GmbH, Německo

Agarosa - Carl Roth GmbH, Německo

Akrylamid - Carl Roth GmbH, Německo

Ampicilin - Sigma, USA

ATP (adenosin trifosfát) - Sigma, USA

Bis-akrylamid - Carl Roth GmbH, Německo

Bromfenolová modř - Sigma, USA

Coomassie Brilliant Blue R-250 - Lachema a.s, ČR

DTT (dithiotreitol) - Carl Roth GmbH, Německo

EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) - Sigma, USA

Glycin - Carl Roth GmbH, Německo

Imidazol - Carl Roth GmbH, Německo

IPTG (isopropy- β -D-thiogalaktopyranosid) - Sigma, USA

LB médium - Carl Roth GmbH, Německo

LB agar - Carl Roth GmbH, Německo

Persulfát amonný - Sigma, USA

Dodecylsulfát sodný (SDS) - Sigma, USA

Síran nikelnatý - Penta, ČR

TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin) - Carl Roth GmbH, Německo

TRIS (tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) - Carl Roth GmbH, Německo

Trypton - Carl Roth GmbH, Německo

β -merkaptoethanol - Carl Roth GmbH, Německo

další běžné chemikálie - Lachema a.s., Neratovice

Všechny chemikálie byly nejméně čistoty p.a.

4.1.2 Přístroje

Centrifuga - pro koncentrování proteinů – Eppendorf 5804r, Německo

Centrifuga - pro mikrozkušavky – Mpw 52, rotor no. 11 3271, Austrálie

Centrifuga - rotor gsa a ss34 – Sorval rc-5b, dupont instruments, USA

Fotonásobič - hamamatsu, r3809u-50, Japonsko

Chromatografie - HPLC-Akta, Amersham Biosciences, Švédsko

Sonikátor - ultrasonic processor, Cole Farmer, USA

Spektrfluorimetr - Photon Counting PC1 ISS, USA

Spektropolarimetr - J-810 - Jasco, Japonsko

Třepačka – Shaking incubator handylab@system, N-biotek, Jižní Korea

Třepačka – Inforsht multitron, Inforsag, Německo

Ultracentrifuga Proteomelab XL-I, Beckman Coulter, USA

UV-LED excitace - PicoQuant, PLS 295-10, Německo

UV-VIS absorpční spektrofotometr - Agilent 8453, USA

UV-VIS absorpční nano-spektrofotometr - Implen, Německo

4.1.3 Ostatní materiál

Dialyzační membrána - MCO (Molecular weight cut off) 3000, 14000 - Roth, Německo

Koncentrátory Centricon (různé typy) - GE Healthcare, USA

Escherichia coli BL21(DE3) i *Escherichia coli* BL21(DE3) "Rosseta" - Stratagene, USA

Inhibitor proteasá - SigmaFAS™ Protease Inhibitor, Sigma-Aldrich, USA

Kity pro izolaci DNA - Thermofisher Scientific, USA

T4 Ligasa - Thermofisher Scientific, USA

Lysozym - New England BioLabs, Velká Británie

Polymerasa Phusion High-fidelity, New England Biolabs, Velká Británie

Restrikční endonukleasy - Thermofisher Scientific, USA

Náplně do kolon (Superdex, chelatující sefaroza, SP/Q sefaroza) - GE Healthcare, USA

cAMP dependentní kinasa, PKA - Promega, USA

standard molekulových vah - Precision Plus Protein Dual Color Standard, BioRad, USA

4.2 *Expresa a purifikace proteinů*

4.2.1 *Expresa*

Jako první krok k expresi proteinu bylo třeba připravit expresní vektor. Jedná se o cirkulární DNA typicky od 3000 do 10000 párů bazí obsahující počátek replikace, gen pro antibiotickou rezistenci a klonovací místo, jež obsahuje velké množství unikátních sekvencí specifických pro jednotlivé restrikční endonukleasy. Tyto enzymy dokáží štěpit DNA na přesně daném místě, zpravidla jde o palindromickou sekvenci šesti nebo osmi párů bazí, za vzniku komplementárních přesahů, což lze využít k vložení DNA cílového genu do vektoru. Takovýto vkládaný úsek však potřebuje mít ty samá restrikční místa, přes která je do vektoru vkládán, na svém 5- i 3-konci. Ty byly připraveny pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR) se speciálně navrženými koncovými oligonukleotidy, které v sobě restrikční místo obsahují a s jejich pomocí gen amplifikovat. DNA vkládaného úseku i vektor byly spojeny přes komplementární úseky zanechané endonukleasami (ThermoFisher Scientific, USA), kovalentní vazba byla zavedena pomocí enzymu ligasy (ThermoFisher Scientific, USA). Výsledný produkt byl transformován teplotním šokem do kmene *Escherichia coli* "Top10" (Invitrogen, USA), které byly v přítomnosti antibiotika kultivovány na misce s LB agarem (připraveného podle předpisu od výrobce) přes noc při 37 °C. Narostlé kolonie (popřípadě náhodně vybrané kolonie, pokud jich narostlo velké množství) byly přeneseny do kapalného LB media (připraveného podle předpisu od výrobce), a opět kultivovány přes noc při 37 °C. Následující den z nich byla izolována DNA, naštěpena stejnými endonukleasami, které byly použity pro vložení genu, a analyzovány pomocí horizontální agarosové elektroforesy. Ta rozdělí vzniklé lineární fragmenty z cirkulárního vektoru podle velikosti, kterou lze za pomoci standardu vizuálně přibližně odečíst. Izolované vektory, které obsahovaly vkládaný úsek byly dále ověřeny sekvenováním podle Sangerova v Laboratoři sekvenace DNA při Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy.

Pokud bylo třeba do expresního vektoru zavést specifickou mutaci, která v exprimovaném proteinu ústí v záměnu aminokyseliny, bylo postupováno podle protokolu pro bodovou mutagenézi od společnosti Stratagen („Quick Change™ Site-

Directed Mutagenesis kit“ (Stratagene, USA), kdy pomocí dvou komplementárních oligonukleotidů s inkorporovanou bodovou mutací byl amplifikován pomocí PCR celý vektor. Výsledná směs byla inkubována 30 minut s endonukleasou DpnI (ThermoFisher Scientific, USA), která specificky štěpí methylované sekvence G(m)ATG, čímž je odstraněna původní DNA bez mutace. Následovala transformace teplotním šokem jako v předchozím případě se selekcí vhodných klonů. Výsledný vektor byl ověřen sekvenováním podle Sangera v Laboratoři sekvenace DNA při Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy.

V případě všech vektorů použitých v této práci byl cílový gen vnesen pod kontrolu T7 promotoru. Jedná se o známý regulační systém pro indukovatelnou rekombinantní expresi proteinů v bakteriální buňce, která má v genomu umístěn gen pro RNA polymerasu z T7 bakteriofága, která specificky nasedá na T7 promotor a zajišťuje mohutnou expresi genu. Gen pro T7 polymerasu je v genomu umístěn pod takzvaný lac-promotor – regulátorovu sekvenci DNA, na níž se váže lac-represor, protein účastnící se regulace energetického metabolismu bakterií. Lac-represor se v nepřítomnosti laktosy silně váže na lac-promotor a brání tak transkripci genu. V přítomnosti laktosy, nebo jejího stabilnějšího a silněji se vázajícího analogu IPTG, však disociuje a translace může probíhat přes bakteriální RNA polymerasu. Přídavek IPTG do média tedy spouští expresi T7 RNA polymerasy, která dále specificky provádí transkripci cílového genu ve vektoru pod T7 promotorem. Analogicky funguje i expresní systém s T5 promotorem, pod nímž probíhá exprese cílového genu s nižší intenzitou než pod T7.

Samotná exprese byla prováděna v expresním kmenu *Escherichia coli* BL21(DE3) (Stratagen, USA). Bakteriální kultura transformovaná příslušným plasmidem pomocí teplotního šoku byla nejprve inkubována přes noc při 37 °C v 5ml LB média se selekčním antibiotikem, následně byla převedena do 1 l LB média se selekčním antibiotikem pro finální expresi a inkubována přibližně 3,5 hodiny při 37 °C dokud nedosáhla optické density 0,6. Následně byl expresní systém indukován přídavkem IPTG na 0,5mM koncentraci. Teplota byla snížena na 25 °C a produkce byla ponechána probíhat 16-18 hodin za stálého třepání 200 otáček za minutu.

U proteinu ASK1 v této práci byla použita bazální exprese podle práce Tan et al. 2001, kde byla ve vektoru pST39 před cílový gen přidána Shine-Dalgarnova sekvence spolu s translačním faktorem zajišťující expresi i v nepřítomnosti IPTG. Při tomto

postupu byla transformovaná kultura inkubována přes noc při 37 °C v 5 ml LB média, následně byla převedena do 1 l LB média a ponechána přes noc 20-24 při 25 °C za stálého třepání 200 otáček za minutu.

Expresy byly podle potřeby prováděny podle výtěžků typicky ze 2-12 l LB media.

4.2.2 Purifikace

Purifikace proteinů se vždy skládala z dezintegrace buněk pomocí lysozymu se sonikací a následně ze sestavy chromatografií a gelové permeační chromatografie nakonec.

Buněčná kultura po expresi byla centrifugována 20 minut při 4 °C a 4000 otáčkách za minutu na velkokapacitní centrifuze. Supernatant byl odstraněn a pelety resuspendovány v lyzačním pufru (PBS, 0,5M NaCl, 4mM imidazol, 2mM β -merkptoethanol). Pufř PBS se skládal z 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 1,4mM KH_2PO_4 o pH 7,3. Od tohoto momentu byly vzorky drženy na ledu při co nejnižší teplotě k omezení případné proteolytické degradace. K resuspendovaným peletům byl přidán lysozym do finální koncentrace 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, s nímž byly inkubovány po 30 minut při 4 °C. Směs byla na ledu sonikována po 10 minut celkového sonikačního času s 3s pulsy a 17s pauzami na přístroji Ultrasonic Processor (ColeFarmer, USA). Sonikát byl potom znovu centrifugován při 13500 otáčkách za minutu při 4 °C 45 min pro oddělení agregátů a zbytků buněk. Supernatant byl odebrán k niklové chelatační chromatografii.

Niklová chelatační chromatografie je založena na silné vazbě mezi histidinovou kotvou na proteinu a atomy niklu navázanými na nerozpustný chelatační nosič. Histidinová kotva se zpravidla skládá z šesti histidinů v aminokyselinové sekvenci proteinu za sebou, může být umístěna na N-konci, C-konci i ve středu, avšak stéricky přístupná pro rozpouštědlo. Na jeden atom niklu se vždy koordinují dva postranní zbytky histidinu, takže protein s histidinovou kotvou silně interaguje se třemi atomy niklu. Nicméně přirozeně se tato aminokyselinová konfigurace vyskytuje pouze u několika proteinů, v praxi je potřeba ji přidat pomocí metod molekulární biologie jako fúzní komponentu. Pro uvolnění proteinu lze použít vysokou koncentraci imidazolu,

který vytěsňuje postranní řetězec histidinu nebo změnu pH pod 4, což ale vzhledem k práci s proteiny není optimální způsob. Jako pevný nosič se nejčastěji používá chelatační sefaroza „Fast-flow“ (GE Healthcare, USA).

Na ekvilibrovanou kolonu naplněnou chelatující sefarozou s navázaným niklem byl nanášen zcentrifugovaný sonikát, přičemž cílový protein interaguje s atomy niklu a je tak na koloně zadržován. Následně byla kolona promyta pufrům s 10mM PBS pH 7,3, 0,5M NaCl, 2mM β -merkapt ethanol, 60mM imidazolem o celkovém objemu 300 ml, který odplaví nespecificky navázané nečistoty. Eluce probíhala ve 20 ml stejného pufru, ale s koncentrací imidazolu 300mM. Čistota a integrita vzorku byla zkontrolována pomocí polyakrylamidové gelové elektroforezy v přítomnosti dodecylsírany sodného za denaturujících podmínek (SDS-PAGE) a to buď s pomocí 12% (w/w) nebo 15% (w/w) polyakrylamidového gelu připraveného podle standardního protokolu. Eluát byl po odebrání vzorků na elektroforesu okamžitě dialyzován do pufru pro další purifikační krok. Pokud byl protein exprimován s odštěpitelnou fúzní komponentou, příslušná proteasa byla přidána k proteinu do dialyzačního střeva.

Pokud čistota proteinu po niklové chelatační chromatografii nebyla dostatečná, bylo přistoupeno k výměnné chromatografii na koloně s iontoměničím Q-sefarozou pro aniontovou výměnu (GE Healthcare, USA) nebo SP-sefarozou pro kationtovou výměnu (GE Healthcare, USA). Proteiny byly předialyzovány do pufru 50mM Tris-HCl pH 8 nebo 8,5 v případě ASK1 proteinkinasy pokud byla zvolena anionová výměna, do pufru s 50mM citrátem sodným o pH 6 místo Tris-HCl v případě kationtové. Pufr dále obsahoval 10mM NaCl, 2mM EDTA, 5mM dithiotreitol. V pufru o nízké koncentraci soli (10mM NaCl byl použit z důvodu zabránění nespecifickým interakcím) jsou na proteinu v příslušném pH přítomné nabitě skupiny podle pI proteinu. V pH, které je přibližně o dvě jednotky vyšší než pI studovaného proteinu převládají záporně nabitě postranní řetězce. Proteiny jsou tak elektrostaticky zachytávány na koloně, která nese kladně nabitě skupiny. V případě kationtové výměnné chromatografie je tomu přesně naopak. Na nosič jsou navázané záporné skupiny a v pufru s pH alespoň o dvě jednotky menším než pI jsou na proteinu přítomné kladné náboje. Eluce dále probíhá aplikací stejného pufru, v němž je protein rozpuštěn, avšak s gradientem NaCl (10-1000mM) v časové škále 30 minut, který postupně nasycí nabitě skupiny, narušuje elektrostatické interakce a uvolňuje tím protein zpět do roztoku. Směs proteinů se tedy dělí podle obsahu svých nabitých skupin, což odráží právě hodnota pI. Celá chromatografie

i generace NaCl gradientu byla zajišťována kapalinovým chromatografem Äkta (GE Healthcare, USA). Čistota a integrita vzorku byla zkontrolována pomocí SDS-PAGE. Vybrané frakce byly koncentrovány pomocí stolní centrifugy a koncentrátoru Centricon (GE Healthcare, USA) s membránou nepropouštějící částice s relativní molekulovou hmotností větší než 13000 a připraveny pro gelovou permeační chromatografii. O použití anionové či kationové chromatografie rozhodovala jednak hodnota pI proteinu, v případě kyselých proteinů s $pI < 6$ je anionový přístup výhodnější, pokud bylo $pI > 6$ byla zpravidla volena kationová výměnná chromatografie. Dalším prvkem byla i stabilita proteinů v nízkém pH okolo 4-6, které je pro kationovou výměnnou chromatografii potřeba.

Jako poslední krok pro ověření oligomerního stavu proteinu byla vždy provedena gelová permeační chromatografie. Tato metoda rozděluje částice podle jejich hydrodynamického poloměru díky pevnému nosiči s póry o definované velikosti. Nejpoužívanější komerční nosič se jmenuje Superdex 10 až 200, přičemž číslo udává maximální relativní molekulovou hmotnost částic v tisících, které jsou ještě na koloně zadržovány (GE Healthcare, USA). V této práci byly použity kolony naplněné Superdex 75 a 200. Velké částice během putování gelovou kolonou difundují do pórů daleko hůře než částice menší a na koloně jsou na rozdíl od malých pouze mírně zpomalovány a vytékají tedy dříve. S použitím vhodného kalibračního vzorku lze i přibližně určit molekulovou hmotnost částice a vzhledem k tomu, že metoda je prováděna za přibližně nativních podmínek, lze ji využít i ke studiu oligomerního stavu a určování velikosti proteinových komplexů. Typicky je však využívána k odstranění agregátů s vysokou molekulovou hmotností ze vzorku. V této práci byl ke všem experimentům použit pufr 20mM Tris-HCl pH 7,5 (50mM Tris-HCl pH 8,0 v případě ASK1), 150mM NaCl (200mM v případě ASK1 a TRX1), 2mM EDTA, 5mM dithiotreitol, 10%(w/v) glycerol. Celá chromatografie byla zajišťována kapalinovým chromatografem Äkta (GE Healthcare, USA). Čistota a integrita výsledného vzorku byla zkontrolována pomocí SDS-PAGE, frakce s vyhovující čistotou byly spojeny, koncentrace určena spektrofotometricky při 280 nm s teoreticky vypočítaným molárním absorpčním koeficientem pomocí aplikace Protparam (<http://web.expasy.org/protparam/>), zakoncentrovány přibližně na 1 mg/ml a zamraženy na -80 °C.

4.2.3 Exprese a purifikace proteinu 14-3-3 a Bmh1

Gen pro lidskou isoformu ζ 14-3-3 byl přes restrikční místa NdeI a BamHI vnesen do T7 expresního systému, vektoru pET15b, s N-terminální histidinovou kotvou. Pro experimenty s fosducinem i ASK1 proteinkinasou byl připraven zkrácený DNA konstrukt 14-3-3 ζ Δ C bez flexibilního C-konce, obsahující aminokyseliny 1-230, kde 231. aminokyselina byla bodovou mutagenezí vyměněna za „stop“ kodon. Všechny proteiny 14-3-3 byly exprimovány v *Escherichia coli* BL21(DE3) s indukci IPTG. Purifikace byla provedena pomocí niklové chelatační chromatografie, aniontové výměnné chromatografie a gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 75 10/300 s průtokem 0,5ml za minutu a s typickým výtěžkem 10 mg na 1 l LB media expresní kultury. Bmh1 ze *Saccharomyces cerevisiae* vnesené stejným způsobem jako 14-3-3 ζ do pET15b bylo produkováno analogicky.

4.2.4 Exprese a purifikace ASK1

Vzhledem k tomu, že protein ASK1 má více než tisíc aminokyselin, byly v *Escherichia coli* exprimovány a purifikovány pouze jednotlivé domény. Gen pro celý protein ASK1 byl darem od Carrol McIntosh (University of Dundee, Velká Británie)

Kinasová doména lidské ASK1 (ASK1-CD, 659-979) byla vnesena do vektoru pST39 společně s Shine-Dalgarnovou sekvencí a translačním enhancerem (viz str. 41) přes restrikční místa XbaI a BamHI s C-terminální histidinovou kotvou odštěpitelnou pomocí proteasy TEV. Vazebné místo na C-konci proteinu pro 14-3-3 bylo bodovou mutagenezí upraveno z RSIS(p)LP na RRIS(p)LP ((p) značí serin, který je *in vivo* fosforylovaný), aby mohlo být fosforylováno pomocí komerční cAMP-dependentní kinasy (PKA). Protein byl produkován v *Escherichia coli* BL21(DE3) po 20-24 hodin při 25 °C. Purifikace byla provedena niklovou chelatační chromatografií, během dialýzy proběhlo odštěpení histidinové kotvy pomocí TEV proteasy s následnou gelovou permeační chromatografií na koloně Superdex 200 26/600 s průtokem 2 ml pufru za minutu. Výtěžek byl přibližně 1 mg na 1 l expresní kultury. Pro *in vitro* přípravu proteinu s fosforylací na vazebném místě pro 14-3-3 byla použita komerční PKA. Reakce byla provedena v pufru na gelovou chromatografii v přítomnosti 12mM MgCl₂,

750 μ M ATP a 200 jednotek PKA na 1 mg proteinu. Reakční směs byla inkubována 2 h při 30 °C, následně při 4 °C přes noc, druhý den bylo přidáno čerstvé ATP odpovídající množství potřebné pro 750 μ M roztok a nová PKA 100 jednotek na 1 mg proteinu. Vzorek byl inkubován další 2 h při 30 °C a předialyzován do pufru vhodného k dalším experimentům. Míra fosforylace byla ověřena hmotnostní spektrometrií na MBÚ AV ČR, provedené Mgr. Petrem Manem, Ph.D.

Oblast ASK1 vázající TRX1, ASK1-TBD, není v literatuře dostatečně popsána a proto byly připraveny čtyři rozdílné konstrukty lidské ASK1 kódující oblasti 46-302, 88-302, 46-322 a 88-322 (konstrukty končící 322. aminokyselinou obsahovali i fragment CC domény) ve dvou expresních systémech: pST39, do nějž byly amplifikované úseky vneseny přes restrikční místa XbaI a BamHI i se Shine-Dalgarnovou sekvencí, translačním enhancerem (viz str. 41) a C-terminální histidinovou kotvou, a T7 systém pRSFDuet-1 za použití míst BamHI a PstI. Modifikovaný vektor pRSFDuet-1 obsahoval před klonovacím místem sekvenci histidinové kotvy spojené se sekvencí pro bakteriální protein GB1. Tento vektor byl darem od Mgr. et Mgr. Evžena Bouří, Ph.D. z ÚOCHB AV ČR. DNA různých úseků ASK1-TBD byla vnesena do vektoru ve čtecím rámci vůči GB1, aby byly exprimovány jako fúzní proteiny s histidinovou kotvou a GB1 na N-konci, přičemž protein GB1 sloužil pro zvýšení míry exprese, rozpustnosti a omezení agregace. Mutant ASK1-TBD 88-302 C250S v pST39, kde cystein na 250. pozici v sekvenci přirozeného proteinu je nahrazen serinem, byl připraven pomocí bodové mutagenese. Proteiny byly produkovány v *Escherichia coli* BL21(DE3), po 20-24 hodin při 25 °C v případě pST39, u pRSFDuet-1 po indukci IPTG 16-18 hodin při 25 °C. Purifikace byla provedena niklovou chelatační chromatografií, u pRSFDuet-1 během dialýzy proběhlo odštěpení histidinové kotvy a GB1 pomocí TEV proteasy, následně byla provedena druhá niklová chelatační chromatografie k odstranění GB1. Po niklové chelatační chromatografii byla provedena gelová permeační chromatografie na koloně Superdex 200 16/60 s průtokem 0,5 ml pufru za minutu. Ze všech výše uvedených konstruktů pouze ASK1-TBD 88-302 v pST39 poskytl protein v dostatečném množství (1 mg na 1 l expresní kultury *Escherichia coli*) i kvalitě a byl tak použit pro další experimenty. Purifikace mutantů ASK1-TBD byly provedeny ve spolupráci s Mgr. Salome Kylarovou a RNDr. Veronikou Obšilovou, Ph.D. z Fyziologického ústavu Akademie věd ČR.

4.2.5 Expres a purifikace TRX1

DNA konstrukt pro expresi lidského TRX1 mutantu C73S (cystein na 73. pozici byl zmutován na serin) byl dar Katji Becker (Justus-Liebig-Universität, Giessen, Německo). Jednalo se o gen TRX1 vnesený do T5 expresního systému pQE-30 s N-terminální histidinovou kotvou. Vzhledem k tomu, že byla popsána možnost dimerizace TRX1 přes cystein 73 disulfidovým můstkem, byla do sekvence TRX1 vnesena mutace zaměňující cystein 73 za serin pro eliminaci této interakce. Mutant C73S je tedy v celé práci označován jako TRX1, neboť byl používán pro veškerá měření a byly z něj bodovou mutagenézí připraveny všechny mutanty: C32S+C35S (TRX1 CS), kde byly zmutovány oba cysteiny v aktivním místě proteinu a TRX1 W31F, kde tryptofan na místě 31 byl vyměněn za fenylalanin. Všechny TRX1 proteiny byly exprimovány v *Escherichia coli* BL21(DE3) s indukcí IPTG. Purifikace byla provedena pomocí niklové chelatační chromatografie a gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 75 10/300 s průtokem 0,5 ml za minutu s typickým výtěžkem 7 mg na 1 l LB media expresní kultury.

Oxidovaná forma TRX1 byla připravena oxidací s pomocí peroxidu vodíku. K 140 μ M TRX1 v pufru bez redukčních činidel byl přidán stonásobný molární nadbytek peroxidu vodíku na dobu 15 minut při 37 °C v celkovém objemu 500 μ l (Hashemy 2008). Oxidace byla zastavena přidávkem 2 jednotek katalasy (Sigma Aldrich, USA). Z důvodů velkého množství různých proteinů byla expres a purifikace TRX1 provedena ve spolupráci s Mgr. Salome Kylarovou a Veronikou Obšilovou, Ph.D z Fyziologického ústavu Akademie věd ČR.

4.2.6 Expres a purifikace fosducinu

DNA kódující potkaní fosducin byl dar od Dr. D.C. Kleina z National Institute of Health, USA. DNA byla vnesena do T7 expresního vektoru pET15b pomocí NdeI a BamHI endonukleas s histidinovou kotvou na N-konci proteinu, zde označováno jako Pdc. Vedle konstruktů s celým fosducinem, byly připraveny konstrukty obsahující pouze C-koncovou globulární doménu (Pdc-CD, 110-246) a bodovou mutací Pdc na glycinu 108 za stop kodon i Pdc-ND (1-107) kódující N-terminální flexibilní region. Všechny

konstrukty fosducinu byly exprimovány v *Escherichia coli* BL21(DE3) s indukcí IPTG. Purifikace byla provedena pomocí niklové chelatační chromatografie, aniontové výměnné chromatografie a gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 200 10/300 s průtokem 0,5ml za minutu a s typickým výtěžkem 2,5 mg na 1 l LB media expresní kultury. Fosducin byl fosforylovaný 1h inkubací při 30 °C s následnou 15h inkubací v 7°C se 120 jednotkami komerční PKA na 1 mg proteinu v přítomnosti 12mM MgCl₂ a 750μM ATP v pufru pro gelovou chromatografii. Vzorek pak byl předialyzován do pufru vhodného pro další experimenty. Míra fosforylace byla ověřena hmotnostní spektrometrií na MBÚ AV ČR, provedené Mgr. Petrem Manem, Ph.D. Všechny exprese a purifikace fosducinu byly prováděny Mgr. Miroslavou Kacířovou na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy.

4.2.7 Expese a purifikace neutrální trehalasy 1

Kódující DNA sekvence neutrální trehalasy byla amplifikována pomocí PCR z genomové knihovny *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (dar od RNDr. Hany Sychrové, DrSc, FGÚ AV ČR) a vnesena do modifikovaného T7 expresního vektoru pET32b (dar od Dr. Ronalda Ronninga, Toledská univerzita, USA) za použití NcoI a BamHI. pET32b poskytuje možnost přidat na N-konec proteinu histidinovou kotvu následovanou thioredoxinem pro zvýšení rozpustnosti proteinu, za něž je možno ve čtecím rámci vnést gen pro Nth1. Nth1 byla exprimována v *Escherichia coli* BL21(DE3) kmenu „Rosetta“ s indukcí IPTG. Purifikace byla provedena pomocí niklové chelatační chromatografie, následně byla pomocí thrombinu odštěpena histidinová kotva s thioredoxinem, následovala kationtová výměnná chromatografie a gelová permeační chromatografie na koloně Superdex 200 10/300 s průtokem 0,5 ml za minutu. Typický výtěžek se pohyboval okolo 1 mg na 1 l LB media expresní kultury. Purifikovaná Nth1 byla fosforylována 2 hodiny při 30 °C a následně při 4 °C přes noc 80 jednotkami komerční PKA na 1 mg proteinu v přítomnosti 750μM ATP a 20mM MgCl₂ v pufru pro gelovou chromatografii. Míra fosforylace byla ověřena hmotnostní spektrometrií na MBÚ AV ČR, provedené Mgr. Petrem Manem, Ph.D. Všechny exprese a purifikace Nth1 byly prováděny Mgr. Miroslavou Kopeckou.

4.3 Analytická ultracentrifugace – metoda sedimentační rychlosti

Ačkoliv měla analytická ultracentrifugace (AUC) významnou roli v historii charakterizace proteinů a komplexů, po mnoho let zažívala tato metodika úpadek díky absenci potřebných technologií pro digitální akvizici dat (Schachman et al., 1992). S vývojem nové instrumentace a zásadním rozvojem počítačových programů pro zpracování dat v posledních dvou dekadách se však její využitelnost signifikantně zvýšila. Díky dostupnosti nových metod zpracování absorpčních nebo interferenčních profilů z měření sedimentační rychlosti byly zavedeny nové postupy pro přesné určování sedimentačních koeficientů a dekonvoluci jednotlivých sedimentujících komponent v interagujících i neinteragujících systémech. I přes rozvoj mnoha jiných biochemických a biofyzikálních metod, AUC zůstává "zlatým standardem" pro rovnovážnou i nerovnovážnou termodynamickou charakterizaci hydrodynamických vlastností makromolekul, proteinových komplexů i protein-proteinových interakcí, zejména díky přístupu, který nevyžaduje modifikaci vzorku. Jedná se taky o jednu z mála metod, která je schopna bez předchozí kalibrace určit nativní relativní molekulovou hmotnost nebo disociační konstanty makromolekul či nanočástic s vysokou přesností. Tyto výhody se stávají o to důležitější, čím více se moderní biochemie a molekulární biologie přesouvá k charakterizacím buněčných interaktomů (souhrn všech protein-proteinových interakcí v studovaném celku) se zjištěním, že právě interakce mezi proteiny jsou rozhodujícím prvkem pro fungování živých organismů.

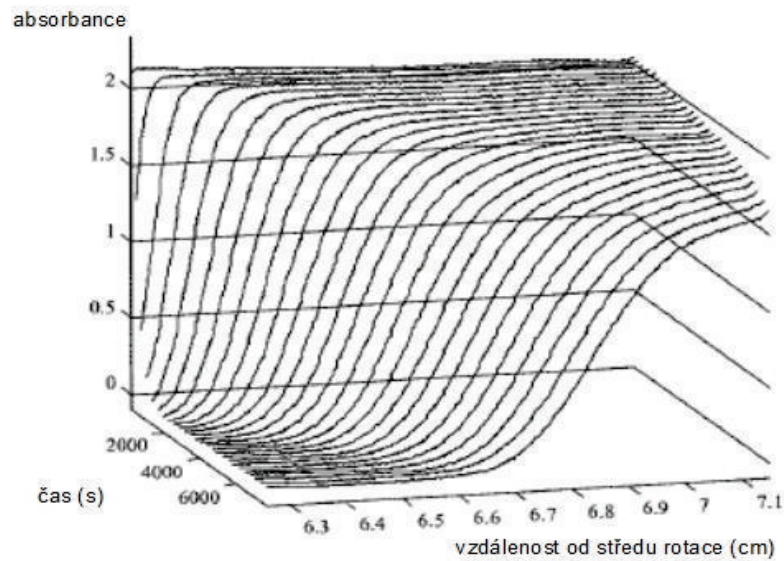
Společnost Beckman-Coulter uvedla na trh analytickou ultracentrifugu ProteomLab XL-I, která má dvě možnosti akvizice dat:

Za prvé je to inkorporovaný absorpční detektor, které je schopen měřit absorpční profily sedimentující částic při vysokých otáčkách rotoru. Vzhledem k tomu, že součástí detektoru je i monochromátor a jako zdroj záření xenonová výbojka, je možné měření v rozsahu vlnových délek 190 – 800 nm. To nabízí významné možnosti selektivity a citlivé detekce závislé na molárním absorpčním koeficientu pro danou vlnovou délku studované látky. Na druhou stranu absorpční detekce má omezený rozsah použitelných koncentrací a studovaná látka musí absorbovat světelné záření.

Druhý, interferenční detektor, má některé signifikantní výhody oproti absorpční metodě akvizice dat. Místo absorpce světla je zde pomocí interferometru s CCD

detektorem měřen profil změny v indexu lomu, který záleží na molární hmotnosti částic. Lze tak detekovat i neabsorbující biomolekuly například polysacharidy. Dále lze studovat asociace nebo změny konformace v přítomnosti jiných látek či ligandů bez obav, že absorpce ligandů by mohla absorpční data učinit neinterpretovatelnými. Koncentrace studovaného roztoku makromolekul též může být daleko vyšší než je rozsah absorpční detekce, což je výhodné zejména pro studium interakcí. Detekční limit je mezi oběma způsoby detekce srovnatelný. Data jsou interferenčním detektorem sbírána téměř okamžitě po celé délce cely, na rozdíl od absorbance, při které je celá cela proměřována bod po bodu a měření jedné cely může zabrat až jednu minutu. To umožňuje interferenci daleko rychlejší akvizici informací, umožňuje studium rychle sedimentujících částic a taky přesnější vyhodnocení sedimentačních dat, neboť interferenční data nejsou zatížena chybou vzniklou delším měřením jako v případě absorpce. Použití interferenční optiky ovšem klade vysoké nároky na kompozici vzorku, neboť ve výsledku jsou zahrnuty všechny nečistoty i sedimentující sole. Pro správné vyhodnocení je kritický slepý vzorek absolutně odpovídající rozpouštědлу, v němž je měřená makromolekula rozpuštěna. Též objem vzorku a slepého vzorku musí navzájem být co možná nejvíce stejné, jinak nebude možné přesně určit pozici menisku. Volba detektoru vždy záleží na charakteru systému, jež je předmětem studia (Schuck et al., 2000).

Vliv odstředivé síly na vzorek způsobuje postupné putování částic od menisku za tvorby takzvané koncentračního rozhraní, které se během experimentu pohybuje směrem ke dnu kyvety jako funkce času (viz obr. 11, strana 51). Definice sedimentačního koeficientu makromolekuly s a parametrů, které hodnotu s určují jsou dány známou Svedbergovou rovnicí (Rovnice 1, strana 51).



Obr. 11: Model vývoje koncentrace proteinu v závislosti na čase a vzdálenosti od středu rotace. (převzato z Lebowitz et al., 2002)

$$s = \frac{u}{\omega^2 r} = M \frac{(1 - \bar{v} \rho)}{N_a f} = MD \frac{(1 - \bar{v} \rho)}{RT} \quad (\text{Rovnice 1})$$

kde u je pozorovaná radiální rychlost makromolekuly, ω je úhlová rychlost rotoru, r je vzdálenost od středu rotace, M je relativní molekulová hmotnost makromolekuly, \bar{v} je specifický parciální objem, ρ je hustota rozpouštědla, N_a je Avogadrova konstanta, f je frikční koeficient, D je difuzní koeficient a R univerzální plynová konstanta. Pro úpravu rovnice do tvaru napravo byl použit vztah $D = RT/N_a f$. Sedimentační koeficient má jednotku S označovanou jako Svedberg a odpovídá 10^{-13} s.

Přes Stokesovu rovnici (Rovnice 2) lze pro hladkou, kompaktní a kulovou částici vypočítat frikční koeficient:

$$f_0 = 6 \pi \eta R_0 \quad (\text{Rovnice 2})$$

kde f_0 je frikční koeficient sférické částice, η je viskozita rozpouštědla R_0 je poloměr koule. Lze potom zkombinovat Stokesovu a Svedbergovu rovnici, v níž je R_0 možno vyjádřit pro kouli jako (Teller et al., 1979; van Holde et al., 1998):

$$R_0 = \left(\frac{3M\bar{v}}{4\pi N_a} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (\text{Rovnice 3})$$

$$s_{koule} = \frac{M(1-\bar{v}\rho)}{N_a 6\pi\eta \left(\frac{3M\bar{v}}{4\pi N_a} \right)^{\frac{1}{3}}} \quad (\text{Rovnice 4})$$

Rovnicí 4 je tedy možno predikovat sedimentační koeficient pro kulovou částici. s_{koule} je taky zároveň maximální sedimentační koeficient jaký může za dané molekulové hmotnosti mít protein, protože kompaktní koule má minimální povrch v kontaktu s rozpouštědlem a protein tedy bude mít minimální frikční koeficient f_0 . Pro přenositelnost dat mezi jednotlivými laboratořemi a různými podmínkami měření je důležité vědět, že parametry ρ a η rozpouštědla výrazně záleží i na teplotě a kompozici pufru. Podle konvence jsou tedy všechny sedimentační koeficienty udávány při standardním stavu vody při 20 °C, přičemž korekce se provádí podle Rovnice 5:

$$s_{20,w} = s_{T,B} \left(\frac{\eta_{T,B}}{\eta_{20,w}} \right) \frac{(1-\bar{v}\rho)_{20,w}}{(1-\bar{v}\rho)_{T,B}} \quad (\text{Rovnice 5})$$

kde T a B značí hodnoty teploty a složení pufru v daném experimentu, index $20,w$ označuje standardní podmínky. Poměr maximálního možného sedimentačního koeficientu s_{koule} ku pozorovanému sedimentačnímu koeficientu $s_{20,w}$, $s_{koule}/s_{20,w}$, je roven poměru experimentálních frikčních koeficientů (f/f_0) a vyjadřuje tvarovou asymetrii od částice tvaru kompaktní koule. Přepočtení experimentálního sedimentačního koeficientu s na $s_{20,w}$ i η a ρ pro různá rozpouštědla je možno provést jednoduše v softwaru SEDNTERP (<http://www.rasmb.bbri.org/>, Laue et al., 1992). SEDNTERP rovněž dokáže vypočítat specifický parciální objem proteinu z jeho aminokyselinové kompozice. Pro další zvýšení přesnosti je třeba znát přesnou hodnotu teploty uvnitř kyvety. Bohužel bylo zjištěno, že mezi přístroji se tyto hodnoty mohou měnit v závislosti na stáří součástí i různých metodách provedení a externí kalibrace je proto žádoucí (Ghirlando et al., 2013).

Data naměřená v průběhu AUC, sedimentační rychlosti, mají charakter koncentračních profilů ve směru od osy rotace jako funkce času. Při tomto experimentu

je na vzorek aplikována velká odstředivá síle působící postupnou sedimentací proteinu ke dnu kyvety (viz obr. 11, strana 51). Nejednodušší možnost vyhodnocení sedimentačního koeficientu sedimentující makromolekuly je tedy založena na detekci pohybu vytvořeného koncentračního rozhraní v silném odstředivém silovém poli. Například lze sledovat posun inflexního bodu koncentračního rozhraní (Svedberg, 1940). Jedná se však spíše o historickou metodu. Současné výpočetní možnosti poskytují daleko přesnější přístupy jako přímé modelování dat pomocí základní rovnice pro putování částic v silovém poli, Lammovi rovnice (Rovnice 6).

$$\frac{\partial \chi(r, t)}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left[rD \frac{\partial \chi(r, t)}{\partial r} - s \omega^2 r^2 \chi(r, t) \right] \quad (\text{Rovnice 6})$$

Tato rovnice popisuje vývoj koncentrační distribuce makromolekulární látky χ v kyvetě jako funkci času t a vzdálenosti od osy rotace r pod vlivem sedimentace i difuze v přesně geometricky tvarovaném sektoru analytické kyvety (Lamm, 1929).

Při měření sedimentační rychlosti molekul, modelování sedimentačních dat pomocí rovnice 6 poskytuje úplnou a přesnou charakteristiku tohoto procesu. Přesnost určení je vysoká, chyba se zpravidla pohybuje pod 1% hlavně díky extenzivnímu množství dat (měření jednoho vzorku se typicky skládá z 30000 bodů s poměrem signál/šum od 100 do 1000). Díky tomu lze z měření extrahovat některé parametry nelineární regresí.

Pro vyhodnocování dat sedimentační rychlosti byl navržen software SEDFIT, který používá numerické metody výpočtů k řešení velkých souborů Lammových rovnic. Díky tomuto obecnému přístupu bez omezujících aproximací je možné studovat širokou škálu sedimentačních dějů pro částice různých velikostí od malých molekul po složité makromolekulární komplexy jako ribozomy, virální kapsidy a jiné nanočástice. Lze jej využít i pro studium interagujících systémů (Schuck et al., 1998). V případě složitějších multikomponentových sedimentačních systémů je očekáváno vytvoření několika koncentračních rozhraní, jež by se měla lišit v rychlosti putování směrem ke dnu kyvety. V realitě jsou však tyto koncentrační gradienty zpravidla rozostřené vlivem rozdílných difuzních koeficientů a lze tak pozorovat pouze jedno atypické rozhraní. Bylo navrženo několik postupů, jak tyto data vyhodnotit (van Holde et al., 1978, Philo et al., 2000), ale v poslední době však převládá metoda výpočtu diferenciálních distribucí sedimentačních

koeficientů $c(s)$ na základě dekonvoluce difuzního efektu. Výpočet je založen na přímém modelování distribucí jednotlivých řešení Lammovi rovnice (rovnice 6). Distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ může být definována jako:

$$a(r, t) = \int c(s) \chi(s, D(s), r, t) ds \quad (\text{Rovnice 7})$$

kde $a(r, t)$ označuje pozorovaná sedimentační data, $c(s)$ je relativní koncentrace sedimentující částice se sedimentačním koeficientem mezi s a $s + ds$, a $\chi(s, D(s), r, t)$ řešení Lammovy rovnice. V softwaru SEDFIT je implementováno numerické řešení rovnice 7 s využitím metody regularizace podle maximální informační entropie systému. Výpočet tedy poskytne hodnoty $c(s)$ pro jednotlivé volitelné úseky škály sedimentačních koeficientů $s + ds$, které odpovídají zastoupení signálu částice se sedimentačním koeficientem mezi s a ds ve vzorku. Vzhledem k tomu, že sedimentační a difuzní koeficient jsou navzájem závislé parametry, je jejich vztah v SEDFITu popisován poměrem frikčních koeficientů (f/f_0), který odráží odchylku tvaru částice od ideální koule. Tento poměr je programem z dat extrahován pomocí nelineární regrese a je též využíván pro přepočítání váženého sedimentačního koeficientu částice získané z distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ na relativní molekulovou hmotnost. Kvalita výsledného modelu je posuzována pomocí střední kvadratické odchylky od experimentálních dat (Schuck et al., 2000).

Pro studium termodynamických aspektů asociací a hetero-asociací molekul se v literatuře obvykle využívala metoda sedimentační rovnováhy, která v této práci není dále diskutována. Nicméně, metodu sedimentační rychlosti je možné využít též zpravidla za podmínek, kdy studované látky nevykazují dostatečnou stabilitu pro časově náročný rovnovážný experiment. Nové přístupy k vyhodnocování sedimentačních rychlostí dokonce už v současnosti umožňují získat stejnou informaci jako z vyhodnocení sedimentačních rovnováh a šetří tak čas i množství použitého materiálu, rovněž vyhodnocení nevyžaduje velké množství výchozích znalostí o systému, je však výpočetně daleko náročnější. Sedimentační rychlost navíc podává dodatečnou informaci o stechiometrii bez předchozí znalosti, sedimentačních koeficientech, hydrodynamickém tvaru (f/f_0) reverzibilně vytvářených oligomerů v roztoku. Sedimentační rovnováha na rozdíl od rychlosti dává přesnější informaci o relativní molekulové hmotnosti díky tomu, že se jedná o rovnovážnou techniku, která nemusí brát v úvahu hydrodynamické aspekty

sedimentace.

Tradičním přístupem k vyhodnocení sedimentační analýzy sedimentujících rychle interagujících systémů je určení souhrnného váženého průměrného sedimentačního koeficientu $s_w(c)$ jako funkce koncentrace. Jedná se o funkci závislou pouze na chemickém složení vzorku. Pokud ve vzorku nejsou interagující částice, její hodnota s měnícími se koncentracemi při daném složení zůstává nezměněna. Pokud však jsou přítomné interakce, začne nabývat se změnami koncentrace odlišných hodnot. Koncentrační závislost $s_w(c)$ může být proložena vaznou izotermou s různými modely vycházejícími z obecné definice rovnovážné konstanty. Rovnice 8 reprezentuje definici s_w pro nejjednodušší interagující systém $A + B \rightleftharpoons AB$. Experimentálně je $s_w(c)$ zjistitelný integrací $c(s)$ přes všechny studované sedimentační koeficienty (Rovnice 9, Correira et al., 2000; Dam et al., 2005b).

$$c_A c_B K = c_{AB} \quad , \quad c_{A,tot} = c_A + c_{AB} \quad , \quad c_{B,tot} = c_B + c_{AB}$$

$$s_w = \frac{s_A \varepsilon_A c_A + s_B \varepsilon_B c_B + s_{AB} (\varepsilon_A + \varepsilon_B) c_{AB}}{\varepsilon_A c_{A,tot} + \varepsilon_B c_{B,tot}} \quad (\text{Rovnice 8})$$

$$s_w = \frac{\int_{s_{min}}^{s_{max}} c(s) s ds}{\int_{s_{min}}^{s_{max}} c(s) ds} \quad (\text{Rovnice 9})$$

kde c_x značí molární koncentraci x -té komponenty, ε_x je molární molární inkrement signálu x -té komponenty, s_x je sedimentační koeficient x -té komponenty a K zdánlivá asociační konstanta systému. Tato metoda je výpočetně nenáročná, ale vyžaduje vyšší množství experimentů. Typicky alespoň pět experimentů při různých koncentracích, již poskytuje dobrý odhad zdánlivé disociační konstanty.

Dalším přístupem pro studium interagujících systému je přímé modelování sedimentačních profilů podle Lammovy rovnice, které je modifikované pro umožnění práce s koncentračně závislými sedimentačními a difuzními koeficienty. Vzhledem k tomu, že pro charakterizaci termodynamické rovnováhy je na jeden experiment sedimentační rychlosti vysoké množství volných parametrů, přistupuje se ke globálnímu

modelování, kdy několik sedimentačních experimentů je prokládáno jedním souborem parametrů v závislosti na schématu interakce. Na rozdíl od vazebné izotermy, přímé modelování poskytuje možnost pomocí nelineární regrese určit větší sadu parametrů včetně úpravy počátečních koncentrací různých komponent vzorků. Tento přístup je přesný avšak náročný na čistotu vzorku. Každá nečistota, o níž nejsou známy sedimentační informace nebo popřípadě není vůbec známo, že by se ve vzorku vyskytovala, vnáší do analýzy signifikantní nepřesnosti, které společně s výpočetně náročným procesem mohou analýzu výrazně ztížit. Je doporučeno používat vazebné sedimentační izotermy k získání počátečních podmínek pro přímé modelování Lammových rovnic pro zjednodušení analýzy.

Obě metodiky pro práci s interagujícími systémy během sedimentačního experimentu jsou včetně velkého počtu vazebných modelů a dalších nástrojů implementovány do softwarového balíku SEDPHAT (Dam et al., 2005a, Dam et al., 2005b).

Všechny experimenty v této práci byly prováděny na přístroji Proteomelab XL-I (Beckman Coulter, USA) s osmisorotorem An-50 Ti. Data byla podle potřeby sbírána absorpční optikou při 280 nm, 250 nm i interferenčně v kyvetách s optickou dráhou 1,2 nebo 0,3 cm, v celkovém objemu 0,4 ml a vyhodnoceny pomocí programů SEDFIT a SEDPHAT uvedenými metodami analýzy vazebných izoterm s_w a přímým modelováním Lammových rovnic. Výsledky modelování Lammových rovnic nebudou uvedeny, neboť se vždy jednalo o verifikaci a případné drobné (do 10%) úpravy počátečních koncentrací proteinů pro analýzy vazebných izoterm s_w . Všechny vzorky byly před měřením dialyzovány proti pufru 20mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM (nebo 200mM v případě ASK1) NaCl a 2mM β -merkaptoethanolu. Pro výpočet přesnosti měření byl posuzován 95% interval spolehlivosti.

4.4 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS)

SAXS je důležitá metoda pro studium všech nanostruktur hmoty. Rentgenové záření je obecně elasticky rozptylováno elektrony v roztoku vzorku, což poskytuje informaci o fluktuacích v elektronové hustotě. Lze jej využít pro studium polymerů, koloidů i biologických makromolekul v roztoku, přičemž je tato metoda stále inovována a s dostupností intenzivních synchrotronových zdrojů rentgenového záření i s pokroky ve výpočetních metodách se stává velmi častým a elegantním nástrojem pro strukturně biologický výzkum.

Když monochromatické rentgenové záření prochází objektem, elektrony zasažených atomů se stávají sekundárním zdrojem záření. V krystalografii, kde molekuly jsou pravidelně uspořádány, toto sekundární záření interferuje za vzniku typického difrakčního obrazce, z kterého lze rekonstruovat elektronovou hustotu v asymetrické jednotce krystalu. Při měření SAXS se však molekuly mohou v roztoku volně a náhodně pohybovat, takže není možno pozorovat žádný difrakční obrazec. Informace o orientaci molekuly je tak sice ztracena, ale informace o velikosti meziatomových vzdáleností a celkovém tvaru částice je v datech stále zachována. Pro měření tak není potřeba krystalické látky.

V praxi je rentgenové záření detekováno pomocí dvourozměrného detektoru. Za předpokladu, že rozptyl je isotropní, výsledný záznam je radiálně zprůměrován a je určena intenzita rozptylu I jako funkce velikosti rozptylového vektoru s :

$$s = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda} \quad (\text{Rovnice 10})$$

kde λ je zde vlnová délka paprsku a θ je polovina úhlu mezi vektorem původního paprsku a vektorem rozptýleného záření. Pro monodisperzní systém složený pouze z jednoho druhu identických částic a správně odečteným pozadím je $I(s)$ úměrná intenzitě rozptylu z částice zprůměrované přes všechny její možné orientace, což může být vyjádřeno jako (Rovnice 11, strana 58):

$$I(s) = \langle I(s) \rangle_{\Omega} = \langle A(s)^2 \rangle_{\Omega} \quad (\text{Rovnice 11})$$

kde amplituda rozptylového vektoru $A(s)$ je Fourierovou transformací distribuce souhrnu všech meziatomových vzdáleností, Ω značí úhel v reciprokém prostoru pro rozptylové vektory s .

Analýza dat podle Guiniera (Guinier, 1939) je nejstarší, avšak stále používanou, metodou analýzy maloúhlového rozptylu. S její pomocí lze rychle určit gyrační poloměr R_g a $I(0)$, intenzitu rozptylu v nulovém úhlu, z Guinierovy rovnice pro monodisperzní roztok částic:

$$I(s) = I(0) \exp\left(-\frac{1}{3} R_g^2 s^2\right) \quad (\text{Rovnice 12})$$

Jedná se o aproximaci platnou pouze pro malá s , typicky v rozsahu $s \cdot R_g < 1,3$. Prakticky jsou hodnoty R_g a $I(0)$ odečteny z Guinierova výnosu kde je $\log[I(s)]$ vyneseno proti s^2 (Guinier, 1939). Pro čistý monodisperzní vzorek tento výnos musí být lineární, přičemž ze směrnice lze vypočítat R_g a z průtnutí přímky s osou y $I(0)$. $I(0)$ nemůže být experimentálně změřeno přímo, neboť tato pozice na detektoru je zakryta clonou chránící záznamovou techniku před poškozením rentgenových záření. Jedná se o dobrý indikátor kvality vzorku, nelineární Guinierův výnos může indikovat nedokonalé odečtení pozadí, polydisperzitu nebo mezičásticové interakce. Tyto efekty lze odstranit sérií měření s následnou extrapolací na nulovou koncentraci (Jacques et al., 2012). Hodnota $I(0)$ normalizovaná na koncentraci vzorku je úměrná relativní molekulové hmotnosti částice, kterou lze s kalibrací známým standardem určit. Ačkoliv je takto vypočítaná hmotnost zpravidla zatížena chybou v určení přesné koncentrace vzorku, je dostatečná pro rozlišení oligomerního stavu (Mylonas et al., 2007).

Další možností určení relativní molekulové hmotnosti je Porodova rovnice. Za předpokladu uniformní elektronové hustoty ve vzorku lze s její pomocí určit hydratační objem částice V_p :

$$V_p = \frac{2\pi^2 I(0)}{Q} \quad Q = \int_0^\infty s^2 I(s) ds \quad (\text{Rovnice 13})$$

přičemž Q označuje Porodovu invariantu. Objem proteinu v nm^3 je typicky 1,5-2 krát větší než molekulová hmotnost uvedená v tisících, z čehož ji lze dopočítat. Tato metoda poskytuje pouze hrubou aproximaci, pokud je však aplikována na data v relativním měřítku, je nezávislá na chybách v určení koncentrace a je tak pomocným nástrojem poskytujícím komplementární informaci k určení molekulové hmotnosti (Porod, 1982).

Další informace o částicích je poskytnuta funkcí distribuce meziatomárních vzdáleností $p(r)$, jež je vypočítána Fourierovou transformací dat z měření SAXS a která vyjadřuje zastoupení jednotlivých délek v molekule:

$$p(r) = \frac{r^2}{2\pi^2} \int_0^\infty s^2 I(s) \frac{\sin(sr)}{sr} ds \quad (\text{Rovnice 14})$$

Lze z jejího průběhu odhadnout přibližný tvar, rozeznat multidomérové proteiny a spočítat maximální délku přítomnou v molekule D_{max} . Přímá kalkulace není díky limitovanému experimentálnímu rozsahu dat možná, je třeba využít nepřímý přístup shrnutý v práci od Glatter et al., 1977.

Nepřímá Fourierova transformace dat ze SAXS je implementována v programu GNOM, který vypočítá $p(r)$ z rozptylové křivky s hodnotou D_{max} , též určenou programem (Svergun et al., 1992). GNOM má možnost vypočítat z $p(r)$ funkce parametry R_g a $I(0)$. Jedná se o přesnější určení než v případě Guinierova výnosu, protože v nepřímé Fourierovi transformaci je použita celá rozptylová křivka a ne pouze malouhlová oblast, která vyhovuje použité aproximaci.

V současnosti jsou tyto uvedené kroky vyhodnocení plně automatizovány. Dovolují rychlou charakterizaci proteinů v nativním stavu a poskytují informaci o velikosti, tvaru a objemu částice. Dostupná jsou i pracoviště s vysokou rychlostí zpracování vzorků i akvizicí dat.

Dalším krokem ve zpracování dat je kalkulace tvaru rozptylové obálky částice *ab initio*, která odráží její tvar v roztoku. Pravděpodobně nejpůvodnější nástroj k tomuto účelu je v současnosti software DAMMIN. Ten využívá k reprezentaci tvaru soubor těsně uspořádaných koulí v objemu (nejčastěji sférickém) daným experimentálně

stanoveným parametrem D_{max} . Každá koule může být přiřazena buďto rozpouštědлу nebo makromolekulárním komponentám. Následuje iterační proces na základě metody simulovaného žíhání zahájený náhodnou konfigurací koulí. V každém kroku je vždy změněna jedna koule, je spočítána teoretická rozptylová křivka a její rozdíl od experimentální dokud není dosaženo významné statistické shody (Svergun et al., 1999). V současné době je k dostání i verze DAMMIF, která odbourává omezenou velikost objemu a celkově zrychluje výpočet až 40krát, což z ní činí ideální program pro okamžité vyhodnocování dat a kalkulaci modelů přímo na synchrotronech. Rozlišení těchto kulových modelů je omezeno předpokladem uniformní elektronové hustoty v rámci částice, který obecně neplatí. Z toho vyplývá, že experimentální rozptylové křivky mohou být použity k analýze pouze v omezeném rozsahu (do přibližně $s = 3 \text{ nm}^{-1}$), což snižuje rozlišení výsledné namodelované rozptylové obálky. *Ab initio* metody též neposkytují unikátní řešení. Z opakovaných výpočtů se stejnými výchozími daty lze dostat řadu odlišných (avšak často velmi podobných) modelů. K redukci těchto nejasností v interpretaci dat ze SAXS je zpravidla třeba porovnat řadu modelů nebo vytvořit jejich průměr (například pomocí programu DAMAVER) (Volkov et al., 2003).

V této práci byla všechna SAXS data naměřena na synchrotronu DESY v Hamburgu, na okruhu Petra III v rámci EMBL (Evropská laboratoř pro molekulární biologii). Použité koncentrace vzorů se pohybovali od 1,5 do 17 mg/ml, vždy byly najednou měřeny čtyři vzorky s klesající koncentrací. Manipulace s experimentálními daty (zprůměrování po normalizaci na intenzitu procházejícího paprsku a odečtení rozptylu pufru) byla provedena v programu PRIMUS (Roessle et al., 2007). R_g a $I(0)$ byly určeny Guinierových výnosem v programu GNOM, stejně tak jako $p(r)$ a D_{max} . Zdanlivá molekulová hmotnost rozpuštěných částic byla stanovena porovnáním $I(0)$ s referenčním vzorkem hovězího sérového albuminu. *Ab initio* modelování rozptylové obálky proteinu bylo provedeno programem DAMMIN s následným zprůměrováním dvaceti modelů v programu DAMAVER. Měření byla provedena v pufru 20mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 2mM β -merkaptoethanol.

4.5 Měření časově rozlišeného dohasínání fluorescence

Proteiny obsahují tři aromatické aminokyseliny (tryptofan, tyrosin a fenylalanin), které mohou přispívat k vnitřní fluorescenci proteinů, přičemž její změna může být použita ke sledování strukturních změn. Tryptofan z nich vykazuje nejvyšší kvantový výtěžek a nejvyšší míru absorpce, k celkové fluorescenci přispívá tedy nejvyšší mírou. Její hodnota je silně závislá na nejbližším okolí fluoroforu zejména na jeho expozici rozpouštědлу. Fluorescenční spektrum se s klesající polaritou okolí posouvá ke kratším vlnovým délkám, intenzita zároveň stoupá. Tryptofanové zbytky, které jsou uloženy hluboko v hydrofobním jádru proteinu tak mohou oproti povrchovým vykazovat signifikantně vyšší dobu života excitovaného stavu a rovněž modrý posun ve fluorescenčním spektru. Změny ve fluorescenci tak mohou napovědět o lokalizaci konkrétních strukturních prvků v rámci molekuly proteinu i jejich přístupu k rozpouštědлу. Měření anizotropie fluorescence je naopak citlivé na rotační možnosti fluoroforu. Pomalejší depolarizace pro něj znamená pomalejší a nebo více omezený lokální či segmentální pohyb. (Lackowicz, 1992).

Dohasínání intenzity a anizotropie fluorescence tryptofanu bylo provedeno na časově korelovaném jednofotonovém čítacím přístroji, který se skládal z femtosekundového excitačního Ti:Safirového laseru s opakovací rychlostí redukovanou na 4 MHz (Chameleon Ultra II a Pulse Picker HP, Coherent) a časově korelovaného jednofotonového čítače s chlazeným fotonásobičem MCP PMT (R3809U-50, Hamamatsu). Emise tryptofanu byla stimulována při 298 nm a měřena při 355nm s použitím monochromátoru a souboru skleněných filtrů UG1 a BG40 (Thorlabs, USA). Vzorky byly umístěny do termostatického držáku a všechny experimenty byly provedeny při 23 °C v pufru 20mM Tris-HCl pH 7,5, 200mM NaCl a 5mM dithiotreitol,

Dohasínání fluorescence bylo měřeno pod „magickým“ úhlem, kde intenzita dohasínání fluorescence $I(t)$ nezáleží na rotační difuzi a lze tak získat nezkreslenou střední dobu života fluoroforu. Při vyhodnocení bylo předpokládáno, že dohasínání fluorescence je multiexponenciální, tedy lze jej vyjádřit jako součet exponenciálních funkcí:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i e^{-t/\tau_i} \quad (\text{Rovnice 15})$$

kde τ_i jsou doby života excitovaných stavů a α_i jsou příslušné amplitudy. Vyhodnocení bylo provedeno metodou maximální informační entropie (Bryan et al., 1999). Výpočet poskytne sadu amplitud α_i , které reprezentují distribuci dob života i -té komponenty. Běžně bylo vybráno 100 dob života rovnoměrně rozmístěných na logaritmické škále od 20 ps do 20 ns. Střední doba života fluoroforu τ_{mean} byla potom vypočítána:

$$\tau_{mean} = \sum_i f_i \tau_i = \frac{\sum_i (\alpha_i \tau_i^2)}{\sum_i (\alpha_i \tau_i)} \quad (\text{Rovnice 16})$$

kde f_i jsou frakční intenzity komponent s příslušnou dobou života .

Dohasínání anizotropie fluorescence $r(t)$ bylo získáno časově rozlišeným simultánním měřením rovnoběžných a kolmých komponent intenzity $I_{\parallel}(t)$ a $I_{\perp}(t)$. Data byla vyhodnocena analogickým způsobem jako v případě dohasínání fluorescence při získávání středních dob života metodou maximální informační entropie. Anizotropie byla analyzována jako součet exponenciálních komponent:

$$r(t) = \sum_i \beta_i \exp(-t/\phi_i) \quad (\text{Rovnice 17})$$

kde β_i reprezentuje distribuci korelačních časů ϕ_i . β_i závisí na počáteční anizotropii podle:

$$r_0 = \sum_i \beta_i \quad (\text{Rovnice 18})$$

Běžně bylo použito 100 korelačních časů rovnoměrně rozmístěných na logaritmické škále od 100 ps do 200 ns.

Všechny fluorescenční experimenty byly prováděny na Fyzikálním Ústavu Matematicko-Fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v Praze ve spolupráci s RNDr. Petrem Heřmanem, CSc. a doc. RNDr. Jaroslavem Večeřem, CSc.

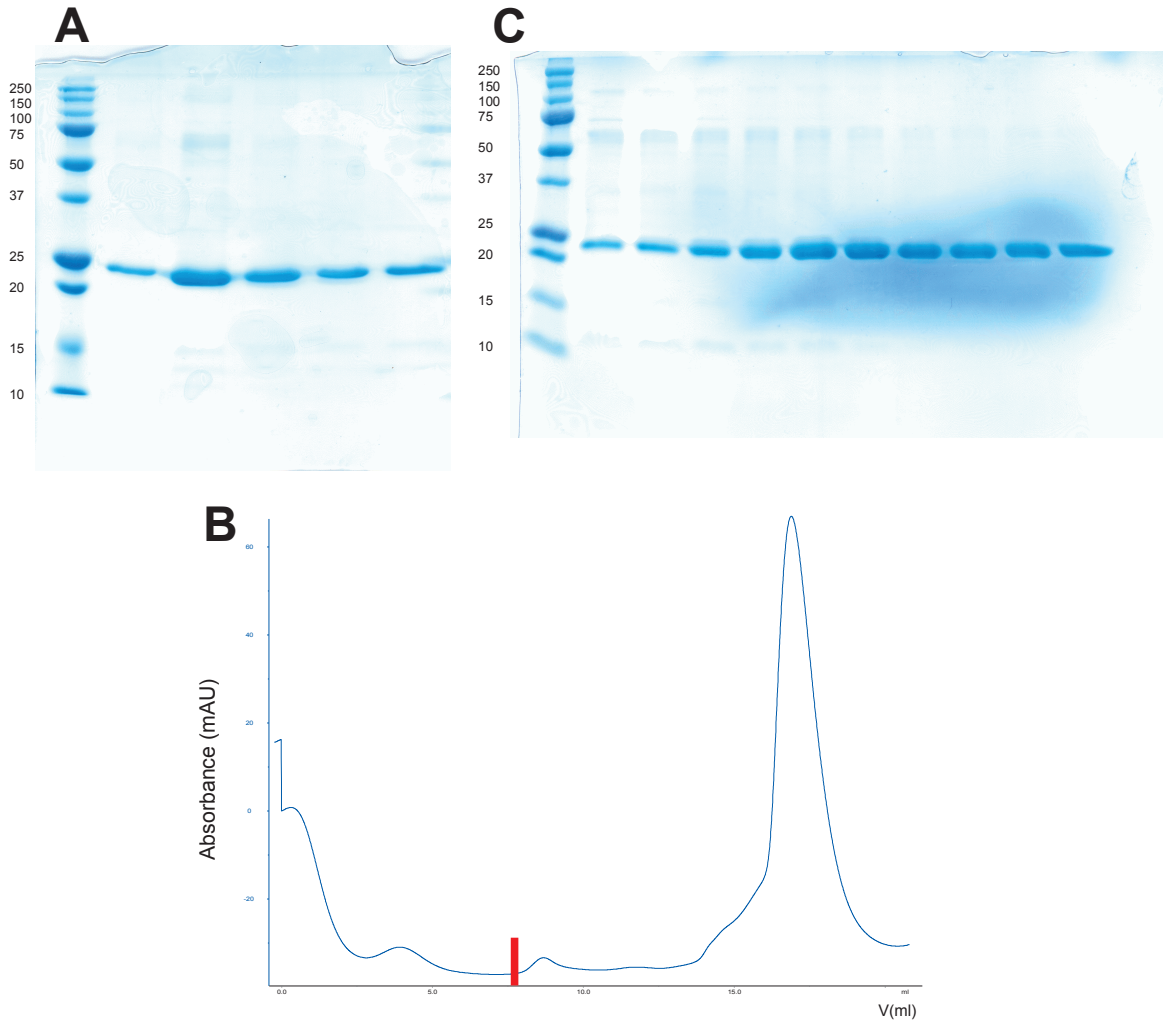
5. Výsledky

5.1 Interakce mezi ASK1-TBD a TRX1

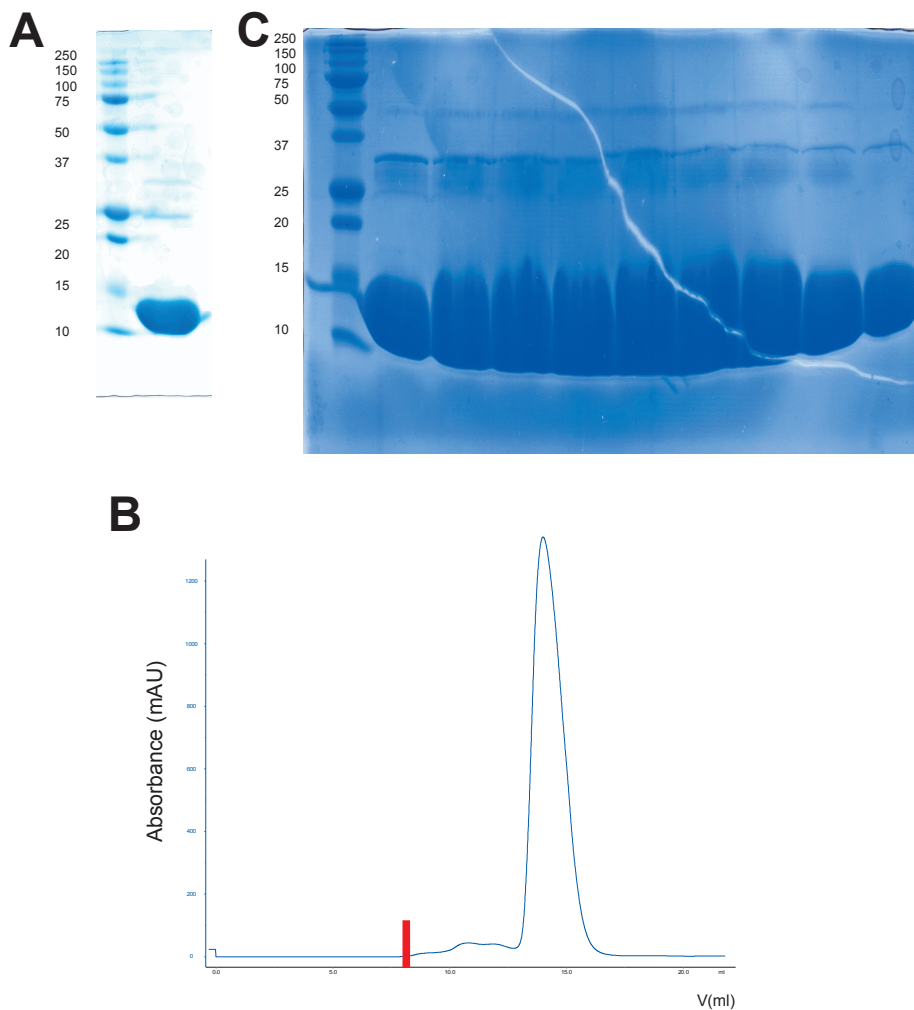
5.1.1 Exprese a purifikace

Bylo ukázáno, že vazebné místo pro TRX1 je na ASK1 umístěno někde mezi 46-277. aminokyselinou od N-konce lidské ASK1. Na základě predikce sekundární struktury programem PSIPRED (Jones et al., 1999) byly navrženy čtyři konstrukty (viz strana 45) buď s C-terminální histidinovou kotvou v systému se zbytkovou bazální expresí pST39 nebo s N-terminální histidinovou kotvou a GB1 pro zvýšení rozpustnosti a stability. Proteiny byly exprimovány v *Escherichia coli* BL21(DE3), avšak pouze jeden protein ASK1-TBD (88-302) s C-koncovou histidinovou kotvou v pST39 vykazoval dostatečnou rozpustnost, stabilitu a výtěžek vhodný ke strukturním studiím. Purifikace probíhala ve dvou krocích, niklovou chelatační chromatografií a gelovou permeační chromatografií s ověřením integrity a čistoty vzorku pomocí SDS-PAGE podle postupu uvedeného straně 42 a 45 (viz obr. 12, strana 64). Stejným postupem byl izolován i mutant ASK1-TBD C250S. Průměrný výtěžek se pohyboval okolo 1 mg proteinu na 1 l expresní kultury v dostatečné čistotě a kvalitě pro další experimenty..

TRX1 a všechny jeho mutanty (CS, W31F) byly exprimovány v *Escherichia coli* BL21(DE3), purifikovány niklovou chelatační chromatografií a gelovou permeační chromatografií podle postupu uvedeného straně 42 a 47 (viz obr 13, strana 65). Kvalita a integrita vzorku byla ověřena pomocí SDS-PAGE. Průměrný výtěžek u všech mutantů se pohyboval okolo 7 mg na 1 l expresní kultury v dostatečné čistotě a kvalitě pro další experimenty. Pro tvorbu komplexu ASK1-TBD:TRX1 byly oba proteiny smíchány dohromady a inkubovány po 30 min při laboratorní teplotě.



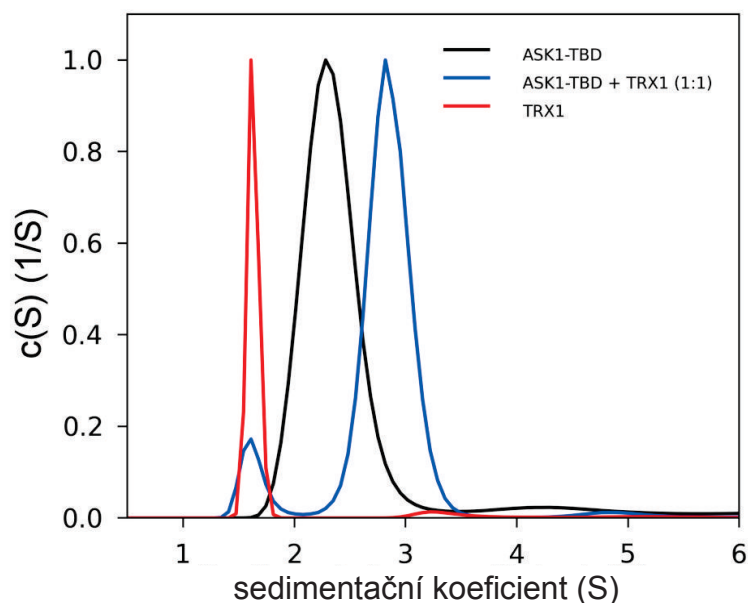
Obr. 12: Souhrn purifikace ASK1-TBD (teoretická relativní molekulová hmotnost 24500). A) SDS-PAGE (15%, w/w) po niklové chelatační chromatografii. Eluce probíhala pomocí pufru s 300mM imidazolem. Frakce obsahující protein byly spojeny a dialyzovány. B) Chromatogram po gelové permeační chromatografii, červená značka označuje prázdný objem kolony. Frakce byly v případě použité kolony Superdex 16/60 sbírány po 0,5ml s průtokem 0,5 ml/min v pufru 20mM Tris-HCl pH 7,5, 200mM NaCl, 2mM EDTA, 5mM dithiotreitol. C) SDS-PAGE (15%, w/w) jednotlivých frakcí z gelové permeační chromatografie obsahující podle chromatogramu ASK1-TBD potvrzující přijatelnou čistotu připravovaného proteinu. Mutant ASK1-TBD C250S byl purifikován analogicky. Popisky u standardu relativní molekulové hmotnosti na SDS-PAGE jsou uvedeny v tisících.



Obr. 13: Souhrn purifikace TRX1 (teoretická relativní molekulová hmotnost 12000). A) SDS-PAGE (15%, w/w) po niklové chelatační chromatografii. Eluce probíhala pomocí pufru s 300mM imidazolem. Eluovaný roztok proteinu byl po odebrání alikvotu na elektroforetickou analýzu okamžitě dialyzován. B) Chromatogram po gelové permeční chromatografii, červená značka označuje prázdný objem kolony. Frakce byly v případě použité kolony Superdex 16/60 sbírány po 0,5ml s průtokem 0,5 ml/min v pufru 20mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 5mM dithiotreitol. C) SDS-PAGE (15%, w/w) jednotlivých frakcí z gelové permeční chromatografie obsahující podle chromatogramu TRX1 potvrzuje přijatelnou čistotu proteinu. Mutanty TRX1 CS, TRX W31F byly purifikovány analogicky. Popisky u standardu relativní molekulové hmotnosti na SDS-PAGE jsou uvedeny v tisících.

5.1.2 Sedimentační analýza ASK1-TBD a TRX1

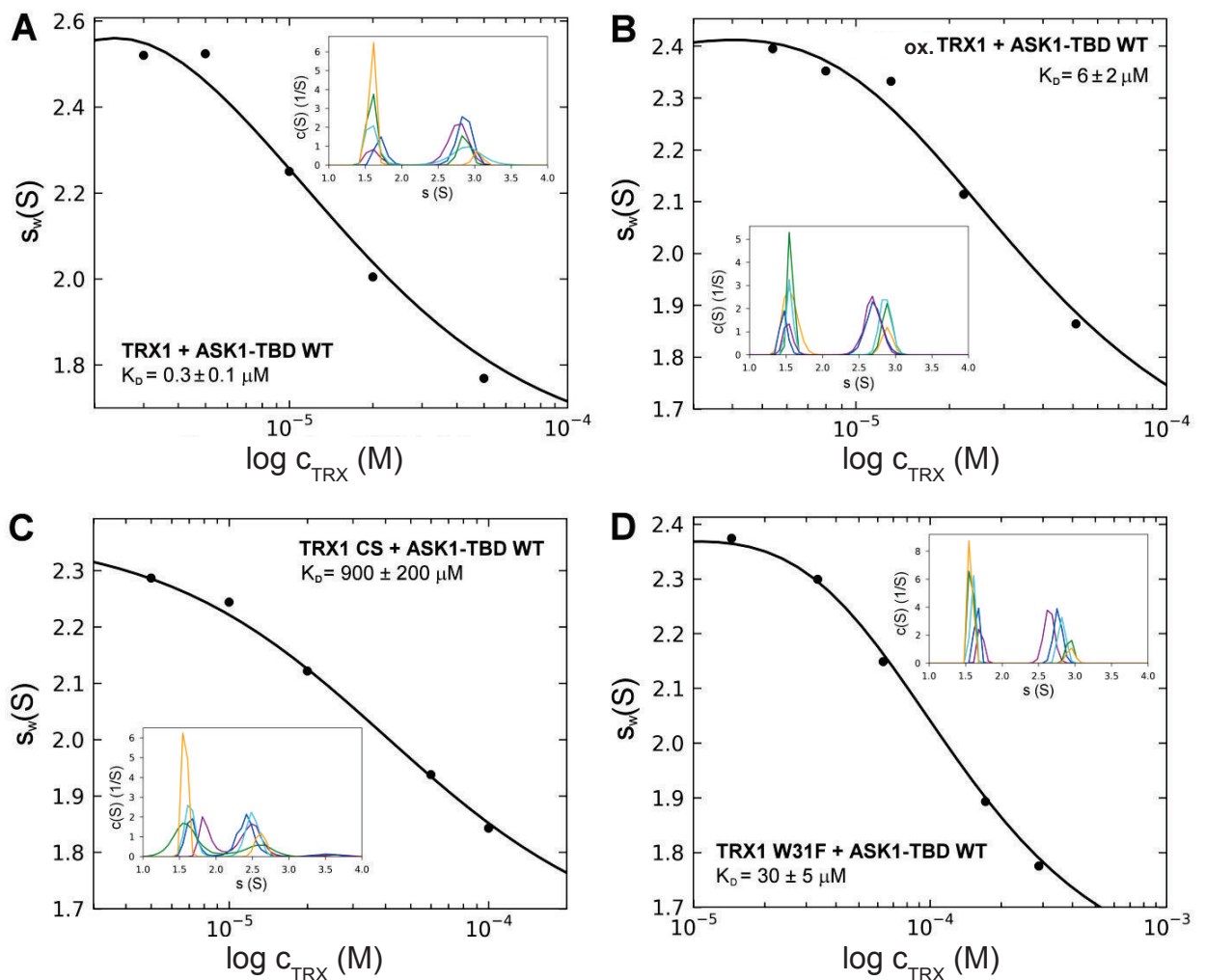
Po purifikaci ASK1-TBD a TRX1 byla provedena biofyzikální charakterizace samotných proteinů a proteinového komplexu z nich složeného. Pro tyto účely byla použita analytická ultracentrifugace (AUC), metoda sedimentační rychlosti, za redukčních podmínek v pufru s 2mM β -merkaptoethanolem při 48000 otáčkách za minutu s akvizicí dat interferenční optikou. Normalizované kontinuální distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ vypočítané z měření sedimentační rychlosti částic odhalily, že redukovaný TRX1 a ASK1-TBD tvoří komplex s $s_{(20,w)} = 3,0$ S, zatímco samotná ASK1-TBD sedimentuje s $s_{(20,w)} = 2,4$ S a TRX1 s $s_{(20,w)} = 1,6$ S (viz obr. 14). Pozorované hodnoty $s_{(20,w)}$ pro ASK1-TBD a TRX1 přibližně odpovídají relativním molekulovým hmotnostem obou proteinů 25000 a 12000, což ukazuje, že oba dva proteiny se v roztoku chovají jako monomery (teoretické relativní molekulové hmotnosti pro ASK1-TBD jsou 25570 a TRX1 12990).



Obr. 14: Porovnání distribucí sedimentačních koeficientů pro samotný TRX1 ($s_{(20,w)} = 1,6$ S, $30\mu\text{M}$), ASK1-TBD ($s_{(20,w)} = 2,4$ S, $30\mu\text{M}$) a komplex ASK1-TBD:TRX1, 1:1 ($s_{(20,w)} = 3,0$ S, $15\mu\text{M} + 15\mu\text{M}$). Malý vrchol v případě komplexu u 1,6 S pravděpodobně odpovídá mírnému koncentračnímu nadbytku TRX1 ve směsi.

Pozorovaná hodnota $s_{(20,w)} = 3,0$ S komplexu ASK1-TBD:TRX1 s relativní molekulovou hmotností přibližně 33000 navíc napovídá, že studovaný komplex má stechiometrii 1:1 (teoretická relativní molekulová hmotnost je 38600). K získání zdánlivé disociační konstanty (K_d) ASK1-TBD:TRX1 bylo připraveno 5 různých koncentračních poměrů (5:3, 1:1, 1:2, 1:4, 1:10) s konstantní koncentrací ASK1-TBD $5\mu\text{M}$ a proměnlivé koncentrace redukovaného TRX1 od $3\mu\text{M}$ do $50\mu\text{M}$. K jejich analýze byla opět použita AUC metoda měření sedimentačních rychlostí při 48000 otáčkách za minutu s akvizicí dat interferenční optikou, neboť absorpční neposkytovala dostatečné rozlišení při nízkých koncentracích. První vyhodnocení dat po získání $c(s)$ distribucí bylo provedeno metodou analýzy vazebné izotermy celkového sedimentačního koeficientu s_w získaného integrací $c(s)$ distribuce. Hodnoty s_w byly vyneseny do grafu jako funkce měnící se koncentrace TRX1 a proloženy vazebným modelem, jež předpokládá stechiometrii reverzibilní vazby 1:1 (viz strana 55).

Tímto postupem byla stanovena K_d jakožto parametr prokládané křivky na $(0,3 \pm 0,1)\mu\text{M}$. To jednak potvrzuje 1:1 stechiometrii komplexu, neboť modely předpokládající jiný poměr poskytly nesmyslný výsledek, a protože experiment byl prováděn v pufru s 2mM β -merkaptoethanolem a zároveň model předpokládá reverzibilní rovnováhu, je možné usuzovat, že interakce mezi ASK1-TBD a TRX1 není zprostředkována mezimolekulární disulfidovou vazbou (viz obr. 15A, strana 68). Výsledek analýzy vazebné izotermy s_w byl verifikován přímým modelováním Lammových rovnic v programu SEDPHAT (výsledek neuveden).



Obr. 15: Analytická ultracentrifugace - měření sedimentační rychlosti. Vážené průměry sedimentačních koeficientů byly vypočítány na základě $c(s)$ distribucí uvedených vždy ve vložených grafech. Zdánlivá disociační konstanta byla určena nelineární regresi z experimentálních dat. A) Izoterma vážených průměrů sedimentačních koeficientů $c(s)$ v závislosti na koncentraci redukovaného TRX1 (3-50 μM) s konstantní koncentrací ASK1-TBD (5 μM). B) Izoterma vážených průměrů sedimentačních koeficientů $c(s)$ v závislosti na koncentraci oxidovaného TRX1 (3-50 μM) s konstantní koncentrací ASK1-TBD (5 μM). TRX1 byl oxidován pomocí peroxidu vodíku (stonásobný molární nadbytek) 15 minut při 37 °C. C) Izoterma vážených průměrů sedimentačních koeficientů $c(s)$ v závislosti na koncentraci redukovaného TRX1 CS (5-100 μM) s konstantní koncentrací ASK1-TBD (20 μM). D) Izoterma vážených průměrů sedimentačních koeficientů $c(s)$ v závislosti na koncentraci redukovaného TRX1 W31F (15-290 μM) s konstantní koncentrací ASK1-TBD (20 μM).

Bylo ukázáno, že oxidace TRX1 narušuje jeho vazbu na ASK1-TBD (Saitoh et al., 1998; Liu et al., 2000; Fujino et al., 2007). Jako další krok tedy byla prostudována pomocí sedimentační analýzy interakce oxidované formy TRX1 a ASK1-TBD. V tomto případě byly ultracentrifugační experimenty prováděny bez přítomnosti redukčního činidla v pufru. Oxidovaný TRX1 byl připraven podle výše uvedeného postupu (viz strana 47), který poskytl protein s disulfidovými vazbami mezi cysteiny 32 a 35 a zároveň mezi cysteiny 62 a 69. Sedimentační charakterizace byla provedena analogicky jako v případě redukovaného TRX1 analýzou sedimentačních profilů s koncentrací ASK1-TBD konstantní $5\mu\text{M}$ a při 5 různých koncentrací TRX1 v poměrech 5:3, 1:1, 1:2, 1:4, 1:10 a následnou analýzou vazebné izotermy celkového sedimentačního koeficientu s_w jako funkce koncentrace TRX1. K_d v tomto případě byla stanovena na $(6 \pm 2)\mu\text{M}$ za použití reverzibilního vazebného modelu se stechiometrií 1:1, což je oproti redukovanému TRX1 signifikantní pokles (viz obr. 15B, strana 68).

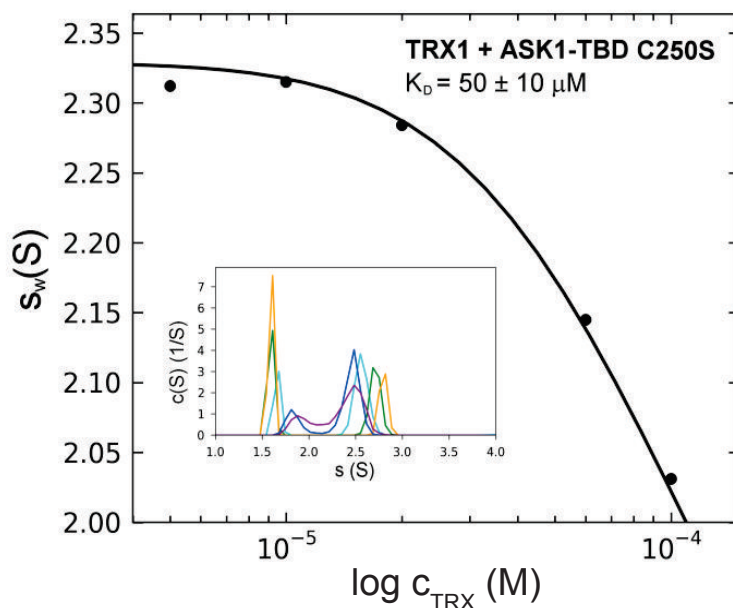
Toto pozorování potvrzuje *in vitro*, že oxidace TRX1 opravdu narušuje vazbu s odpovídajícím vazebným regionem na ASK1 a že katalytický region TRX1 $^{31}\text{WCGPC}^{35}$ je pravděpodobně pro interakci důležitý prvek.

Pro ověření, zda tento region má na snížení vazebné afinity po oxidaci TRX1 přímý vliv, byl pomocí sedimentační analýzy studován mutant TRX1 CS, kde cysteiny 32 a 35 byly vyměněny bodovou mutagenézí za seriny. Analýza byla provedena analogicky jako v případě redukovaného TRX1 a ASK1-TBD s konstantní koncentrací ASK1-TBD $20\mu\text{M}$. Zvolené koncentrace byly vyšší, neboť byla předpokládána vyšší K_d , která by v koncentračním rozhraní použitým pro TRX1 nemusela být určena spolehlivě. Koncentrace TRX1 CS byla zvolena v intervalu $5\text{-}100\mu\text{M}$ v poměrech ASK1-TBD:TRX1 CS 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5. Při vyhodnocení vazebné izotermy celkového sedimentačního koeficientu s_w jako funkce koncentrace TRX1 CS bylo skutečně zjištěno, že K_d je pro tento systém $(0,9 \pm 0,2)\text{mM}$ za použití reverzibilního vazebného modelu se stechiometrií 1:1 (viz obr. 15C, strana 68), což v biologickém kontextu znamená, že vazebná afinita pro TRX1 CS je zanedbatelná. Toto pozorování je plně ve shodě s pozorováním jiných výzkumných skupin (Saitoh et al., 1998; Liu et al., 2000; Fujino et al., 2007).

Kromě cysteinů obsahuje katalytický motiv TRX1 i tryptofan na 31. pozici, který je v blízkosti aktivních cysteinů a byl dokumentován jako jediná aminokyselina, která po oxidaci TRX1 a uzavření disulfidového můstku mezi cysteiny 32 a 35,

výrazněji změni konformaci (Weischel et al., 1996; Qin et al., 1994). Vzhledem k tomu, že oxidovaný TRX1 i TRX1 CS ovlivňují vazbu na ASK1-TBD, byl prozkoumán i vliv tryptofanu 31 na interakci mezi mutantem TRX1 a ASK1-TBD sedimentační analýzou mutantu TRX1 W31F. Ultracentrifugační experiment byl proveden analogicky jako v případě redukovaného TRX1 a ASK1-TBD. Koncentrace TRX1 W31F byly zvoleny v intervalu 15-290 μ M v poměrech ASK1-TBD:TRX1 W31F 4:3, 1:2, 1:4, 1:10, 1:29 s koncentrací ASK1-TBD konstantní 20 μ M. Po vyhodnocení vazebné izotermy celkového sedimentačního koeficientu s_w jako funkce koncentrace TRX1 W31F bylo zjištěno, že K_d je pro interakci tohoto systému zvýšena na $(30 \pm 5)\mu$ M za použití reverzibilního vazebného modelu se stechiometrií 1:1 (viz obr. 15D, strana 68), což potvrzuje důležitost této aminokyseliny pro tvorbu vazby a stabilitu komplexu.

Vedle mutací na proteinu TRX1 bylo nalezeno, že cystein na 250. pozici v aminokyselinové sekvenci ASK1 je rovněž pro vazbu TRX1 důležitý a jeho mutace inhibuje interakci mezi ASK1 a TRX1 *in vivo* (Zhang et al., 2004; Nadeau et al., 2009). Pro zjištění a posouzení významnosti této mutace byla rovněž provedena sedimentační analýza redukovaného TRX1 a ASK1-TBD C250S analogicky jako v případě redukovaného TRX1 a ASK1-TBD. Fixní koncentrace ASK1-TBD C250S byla zvolena pro všech pět vzorků 20 μ M, koncentrace TRX1 se měnily v rozsahu 5-100 μ M v poměrech ASK1-TBD C250:TRX1 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5. Analýza potvrdila, že vazba mutantu ASK1-TBD C250S je na TRX1 signifikantně slabší s K_d stanovenou na $(50 \pm 10)\mu$ M za použití reverzibilního vazebného modelu se stechiometrií 1:1 (viz obr. 16, strana 71).



Obr. 16: Izotermie vážených průměrů sedimentačních koeficientů v závislosti na koncentraci TRX1 pro mutant ASK1 C250S. Zdánlivá disociační konstanta byla vypočítána nelineární regresí z experimentálních dat.

5.1.3 Časově rozlišené měření dohasínání fluorescence

Protože tryptofan 31 v sekvenci TRX1 je jediný tryptofan v celé molekule a v sekvenci ASK1-TBD není přítomný žádný, bylo pro další studium interakcí mutantů TRX1 a ASK1-TBD použito časově rozlišené měření dohasínání intenzity a anizotropie tryptofanové fluorescence. Obojí bylo analyzováno pomocí metody maximální informační entropie. Tvorba komplexu významně zvýšila střední dobu života excitovaného stavu (τ_{mean}) z 1,62 na 3,34 ns (viz tabulka 1, strana 73). Tento efekt může reflektovat konformační změnu v TRX1 indukovanou vazbou ASK1-TBD, která může ovlivňovat interakci tryptofanu 31 s jeho okolím. Pozorované zvýšení τ_{mean} též může znamenat přímé zapojení postranního řetězce tryptofanu 31 do interakce s ASK1-TBD. Redukoval by se tak jeho kontakt s polárním prostředím rozpouštědla nebo by byly ovlivněny zhášecí interakce v jeho blízkosti.

Měření emisních anizotropií odhalilo velké změny v mobilitě tryptofanu 31 TRX1 v závislosti na přítomnosti nebo absenci ASK1-TBD ve vzorku (viz obr. 17A a 17B, strana 74). Porovnáním rychlosti depolarizace mezi samotným TRX1 a komplexem ASK1-TBD:TRX1 lze jasně ukázat, že depolarizace fluorescence

tryptofanu 31 je u komplexu daleko pomalejší. Rychlost depolarizace může být přímo vztažena k rotační volnosti fluoroforu. Pomalejší depolarizace pro něj znamená pomalejší a nebo více omezený lokální či segmentální pohyb. Z tohoto pohledu vazba ASK1-TBD redukuje segmentální flexibilitu aktivního místa TRX1, kde se nachází tryptofan 31. Toto pozorování je plně ve shodě s pozorovanou změnou τ_{mean} , která odráží fakt, že aktivní centrum účastníci se interakce má omezenější přístup k polárním okolí či jsou potlačeny zhasací vlivy v jeho těsné blízkosti. Data z matematické analýzy dohasínání anizotropie fluorescence jsou také ve shodě s experimentem. Data samotného TRX1 poskytly dva druhy krátkých rotačně-korelačních časů, jeden velmi krátký nerozlišený ($\Phi_1 < 100$ ps) a druhý Φ_2 přibližně 1,7 ns (viz tabulka 1, strana 73). Kromě nich vyplynul z dat i třetí korelační čas $\Phi_{long} = 10$ ns, který může být přiřazen celkovému rotačnímu pohybu TRX1 a jeho hodnota je přibližně odpovídající hodnotě očekávané pro globulární protein s relativní molekulovou hmotností 13000 (Lackowicz, 1992). Tvorba komplexu vedla k eliminaci nejrychlejší komponenty Φ_1 odpovídající nejrychlejším pohybům tryptofanu 31. Naopak rotačně korelační čas odpovídající segmentálním pohybům Φ_2 vzrostl z 1,7 na 3,3 ns ($\Phi_2 \rightarrow \Phi_3$; viz tabulka 1, strana 73). Utvoření komplexu také mírně snížilo součet amplitud rychlých rotačně-korelačních časů β_{short} ($\beta_{short} = \beta_1 + \beta_2 + \beta_3$), což naznačuje úhlové omezení pohybu. Všechny tyto změny mohou být dohromady interpretovány jako signifikantní redukce segmentální flexibility aktivního motivu TRX1 s tryptofanem 31 po vazbě na ASK1-TBD. Nejdelší rotačně korelační čas Φ_{long} navíc vykazoval po vazbě nárůst na 30 ns a odrážel tak zvýšenou relativní molekulovou hmotnost částice komplexu oproti samotnému TRX1. Jeho hodnota odpovídá relativní molekulové hmotnosti očekávané pro komplex ASK1-TBD:TRX1 38600. Tyto výsledky silně naznačují, že tryptofan 31 v aktivním místě TRX1 se přímo účastní interakce s ASK1-TBD.

Paralelně byl pomocí časově rozlišené analýzy dohasínání intenzity a anizotropie fluorescence studován podrobněji i mutant ASK1-TBD C250S s TRX1. Měření emisní anizotropie odhalila rozdílné hydrodynamické vlastnosti tryptofanu 31 mezi případy, kdy TRX1 interagoval s ASK1-TBD nebo s ASK1-TBD C250S. Na rozdíl od ASK1-TBD analýza dat u mutantu ASK1-TBD C250S odhalila čtyři rotačně-korelační časy. První byl extrémně krátký ($\Phi_1 < 100$ ps), dva další odpovídající segmentálním pohybům ($\Phi_2 = 1,3$ ns, $\Phi_3 = 3,8$ ns) a čtvrtý rotačně-korelační čas $\Phi_{long} = 38$ ns odrážející rotační pohyb celé částice komplexu (viz tabulka 1, strana 73). Simultánní přítomnost rotačně

korelačních časů přítomných jak v samotném TRX1 tak i v komplexu ASK1-TBD:TRX1 naznačuje nekompletní vazbu a pouze částečnou tvorbu komplexu, kdy pouze část TRX1 interaguje s ASK1-TBD C250S. Toto pozorování je ve shodě s měřením sedimentačních vlastností AUC, které ukazuje, že TRX1 interaguje s ASK1-TBD C250S se výrazně nižší afinitou v porovnání s ASK1-TBD. Navíc byl v případě komplexu ASK1-TBD C250S:TRX1 pozorován daleko větší nárůst střední doby života excitovaného stavu τ_{mean} , = 4,52 ns v porovnání s 3,34 ns pro komplex ASK1-TBD:TRX1 (viz obr. 17C, strana 74). Toto naznačuje, že tryptofan 31 v TRX1 interaguje s ASK1-TBD C250S jiným způsobem v důsledku rozdílné konformace ASK1-TBD C250S nebo odlišnou interakcí na mezimolekulárním rozhraní. Jak ultracentrifugační tak fluorescenční data komplexu ASK1-TBD C250S:TRX1 dohromady odhalují, že cystein 250 v sekvenci ASK1 se velmi pravděpodobně nachází v bezprostřední blízkosti aktivního centra TRX1 a pro interakci mezi proteiny je naprosto zásadní.

Tabulka 1: Přehled časově rozlišeného dohasínání fluorescence tryptofanu 31 v TRX1

Vzorek	$\tau_{mean}^{a,c}$ (ns)	$\beta_1^{b,d}$	$\phi_1^{b,e}$ (ns)	$\beta_2^{b,d}$	$\phi_2^{b,e}$ (ns)	$\beta_3^{b,d}$	$\phi_3^{b,e}$ (ns)	$\beta_{long}^{b,d}$	$\phi_{long}^{b,e}$ (ns)
TRX1	1,62	0,018	< 0,1	0,069	1,7	-	-	0,133	10
TRX1+ASK1-TBD	3,34	-	-	-	-	0,079	3,3	0,141	30
TRX1+ASK1-TBD C250S	4,52	0,026	< 0,1	0,024	1,3	0,034	3,8	0,136	38

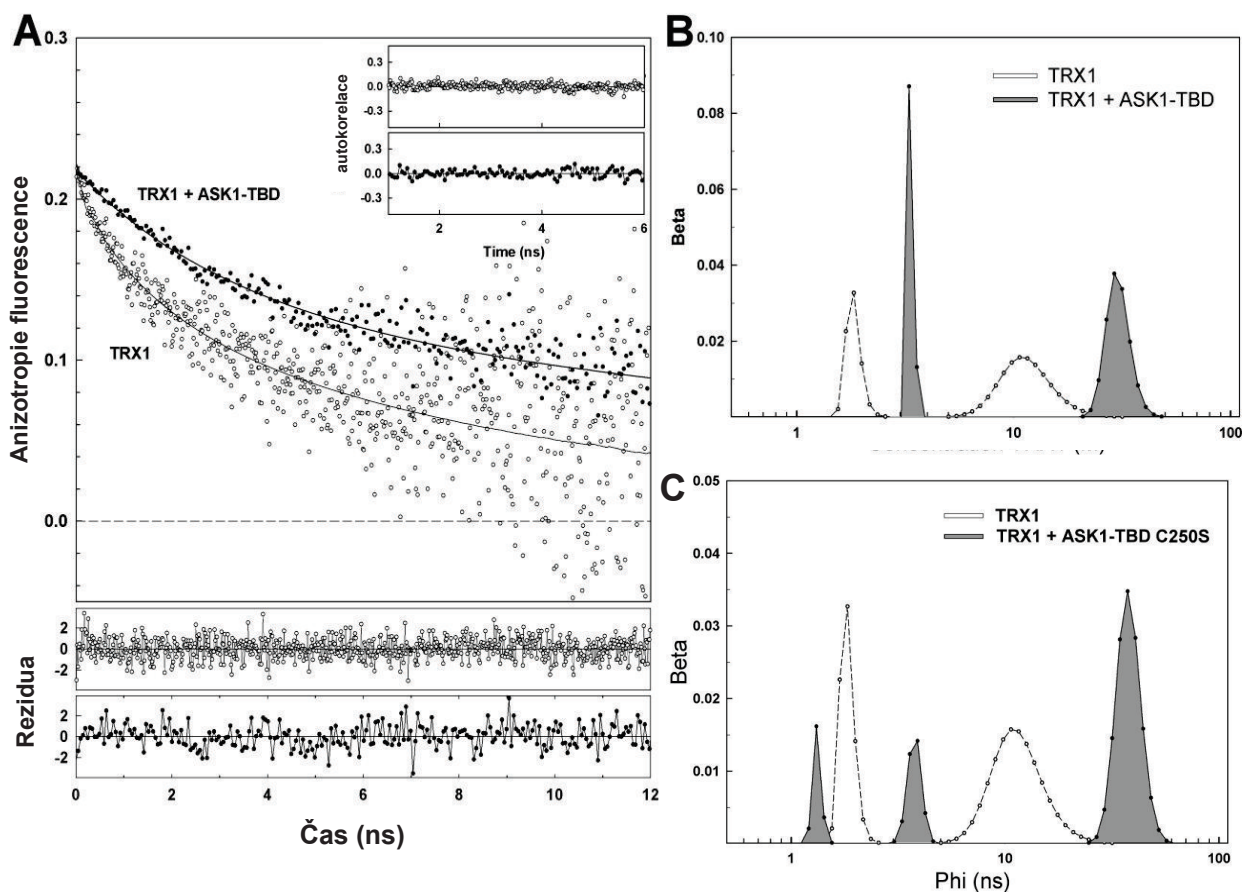
^a Střední doba života fluoroforu (τ_{mean}) byla spočítána přes rovnici 16.

^b Anizotropie fluorescence $r(t)$ byla analyzována jako soubor exponenciálních funkcí (Rovnice 17), kde amplitudy β_i reprezentují distribuci rotačně korelačních časů ϕ_i . Počáteční anizotropie tryptofanu 31 ve všech vzorcích je $r_0 = 0,22 \pm 0,01$. Amplitudy β_i byly vypočítány jako $\beta_i = r_0 - (\beta_2 + \beta_3 + \beta_{long})$ pro každý vzorek.

^c $S_r = 0,05$ ns

^d $S_r = 0,005$

^e $S_r = 15\%$



Obr. 17: Časově rozlišené měření dohasínání anizotropie fluorescence tryptofanu 31 v TRX1. A) dohasínání anizotropie fluorescence bylo porovnáváno mezi TRX1 v přítomnosti ASK1-TBD (černě) a nepřítomnosti (šedě), v panelech níže jsou uvedena rezidua vůči vypočítané funkci. Kvalita výpočtu je rovněž ukázána pomocí autokorelační funkce (vložený graf, černě pro ASK1-TBD + TRX1, šedě pro TRX1). B) Distribuce rotačně korelačních časů tryptofanu 31 v TRX1 v nepřítomnosti a přítomnosti ASK1-TBD. Nerozlišená rotační komponenta s velmi krátkým rotačně-korelačním časem ($\Phi_l < 100$ ps) pozorovaná u samotného TRX1 není zobrazena. C) Distribuce rotačně korelačních časů tryptofanu 31 v TRX1 v nepřítomnosti a přítomnosti ASK1-TBD C250S. Nerozlišená komponenta rotačně korelačního času TRX1 není zobrazena stejně jako na obr. 17B.

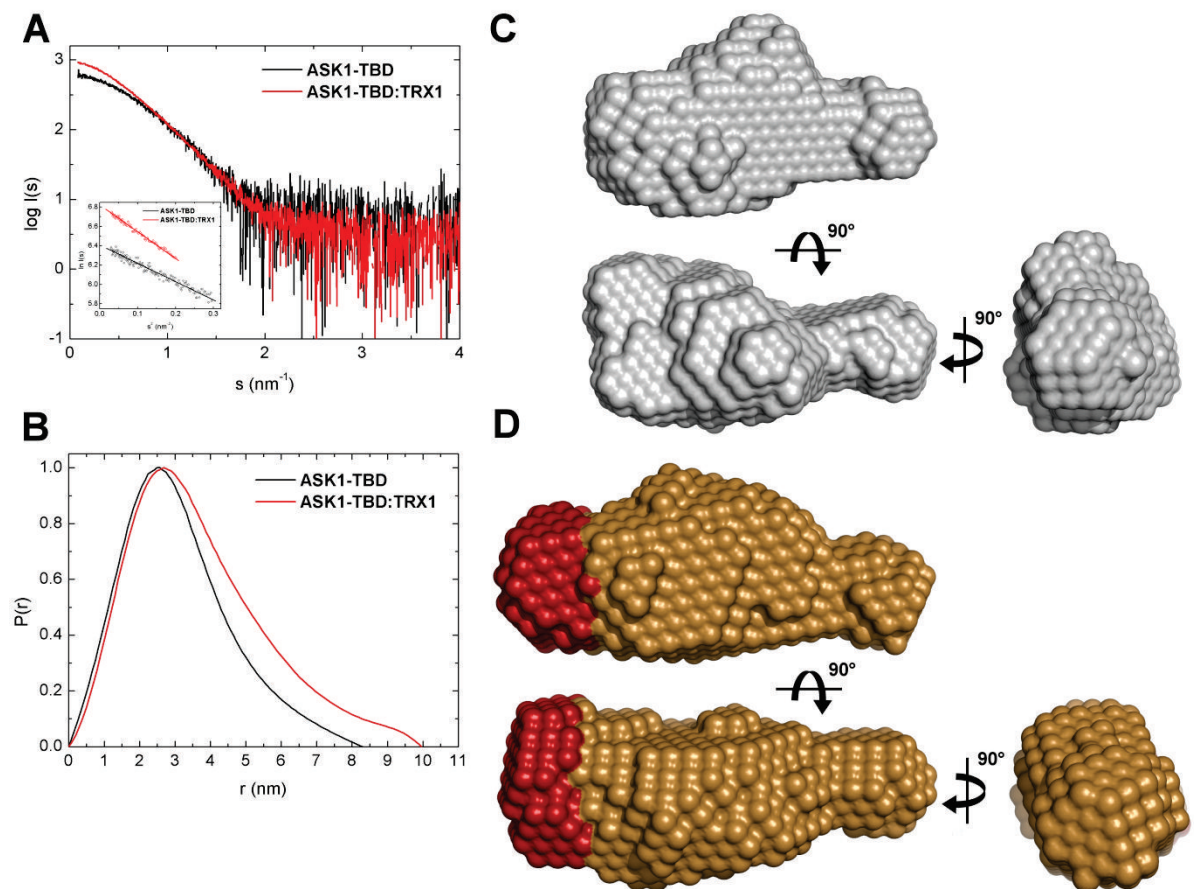
5.1.3 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření

Pro získání lepší vizuální představy, jak může komplex ASK1-TBD:TRX1 vypadat v roztoku byla zvolena metoda maloúhlového rozptylu rentgenového záření (SAXS). K tomu bylo přikročeno paralelně s pokusy o získání krystalu komplexu, které však do současnosti nevedly k úspěchu. Experimentální data pro samotný protein ASK1-TBD i komplex s TRX1 jsou uvedeny v obr. 18A, strana 76. Kvalita experimentálních dat a zejména nepřítomnost agregovaného proteinu ve vzorku byla ověřena linearitou Guinierova výnosu v oblasti jeho platnosti pomocí programu GNOM. Zdánlivé relativní molekulové hmotnosti ASK1-TBD a komplexu ASK1-TBD:TRX1 byly odhadnuty porovnáním přímé intenzity rozptylu $I(0)$ s hodnotou pro referenční hovězí sérový albumin (viz tabulka 2, strana 77). Takto zjištěná relativní molekulová hmotnost 37000 pro komplex dobře odpovídá předpokladu vazebné stechiometrie 1:1 (teoretická relativní molekulová hmotnost 38600) a je v souladu i s výsledky ultracentrifugačních pokusů. Hodnoty R_g vypočítané z Guinierova výnosu i z funkce distribuce meziatomárních vzdáleností ($p(r)$) naznačují, že komplex má spíše více asymetrický tvar než samotná ASK1-TBD (viz tabulka 2, strana 77). To bylo potvrzeno i $p(r)$ funkcí, která poskytla maximální vzdálenost D_{max} samotné ASK1-TBD 82 Å zatímco pro komplex ASK1-TBD:TRX1 byla tato hodnota 99 Å (viz obr. 18B, strana 76). Jedná se o další potvrzení toho, že komplex obou proteinů vykazuje více protáhlý a asymetrický tvar než ASK1-TBD.

Pro rozšíření informace o tvaru těchto proteinů byly *ab initio* za pomoci programů DAMMIN a DAMAVER z rozptylových dat vypočítány rozptylové obálky, které odráží tvar částic v roztoku. Rekonstruované tvary se skládaly z průměru nejméně deseti individuálních rekonstrukcí, které však mezi sebou z porovnání prostorové rozdílnosti velmi dobře souhlasily. Obálka pro samotnou ASK1-TBD (viz obr. 18C, strana 76) ukazuje, že tato doména má kompaktní, mírně asymetrickou konformaci s jednou stranou užší než druhou. Obálka komplexu je podobná, ale ukazuje více protažený tvar tlustší části komplexu, což naznačuje, že TRX1 interaguje s tímto objemnějším koncem ASK1-TBD. Velikost přibližně 20×35×30 Å i tvar této dodatečně oblasti (zobrazena červeně v obr. 18D, strana 76) dobře odpovídá velikosti i tvaru molekuly TRX1. Porovnání obou obálek rovněž naznačuje, že obě molekuly interagují přes poměrně velké interakční rozhraní než přes pouze několik málo kontaktů. Lze též

pozorovat, že vazba TRX1 neindukuje v ASK1-TBD žádnou dramatickou strukturní změnu, ačkoliv nelze vyloučit lokální konformační pod rozlišením použité metody.

Strukturní model ASK1-TBD:TRX1 byl vytvořen vhodným umístěním známé krystalové struktury TRX1 a *ab initio* modelovanou ASK1-TBD (výsledek neuveden). Homologní modelování nemohlo být v tomto případě použito, protože k této doméně nejsou známy žádné strukturně homologní proteiny se známou prostorovou strukturou. Modelování bylo provedeno prof. RNDr. Tomášem Obšilem, Ph.D. s pomocí serveru Robetta (Song et al., 2013) a výsledek je ve shodě se všemi zjištěnými daty.



Obr. 18: Strukturní charakterizace ASK1-TBD a jejího komplexu s redukovaným TRX1 pomocí SAXS. A) Intenzita rozptylu jako funkce rozptylového vektoru s ($s = 4\pi\sin(\theta)/\lambda$, kde 2θ je úhel rozptylu a λ vlnová délka). Vložený graf ukazuje Guinierův výnos ASK1-TBD (2,3 mg/ml) i komplexu ASK1-TBD:TRX1 (6 mg/ml). B) Distribuce meziatomárních vzdáleností $p(r)$. C) Zprůměrované vypočítané obálky z programu DAMMIN pro samotnou ASK1-TBD. D) Zprůměrované vypočítané obálky z programu DAMMIN pro komplex ASK1-TBD:TRX1. Hlavní rozdíl mezi tvary ASK1-TBD a komplexu je zobrazen červeně.

Tabulka 2: Strukturální parametry určené ze SAXS

Vzorek	R_g^a (Å)	R_g^b (Å)	$M_{r(0)}^c$	D_{\max}^d (Å)
ASK1-TBD	$23,7 \pm 0,3$	$24,2 \pm 0,2$	25000	82
ASK1-TBD:TRX1	$28,9 \pm 0,2$	$29,3 \pm 0,1$	37000	99

^a Určeno Guinierovou aproximací

^b Určeno z $p(r)$ funkce

^c Určeno srovnáním počáteční intenzity rozptylu $I(0)$ s referenčním hovězím sérovým albuminem.

^d Určeno nepřímou Fourierovou transformací s experimentálních dat.

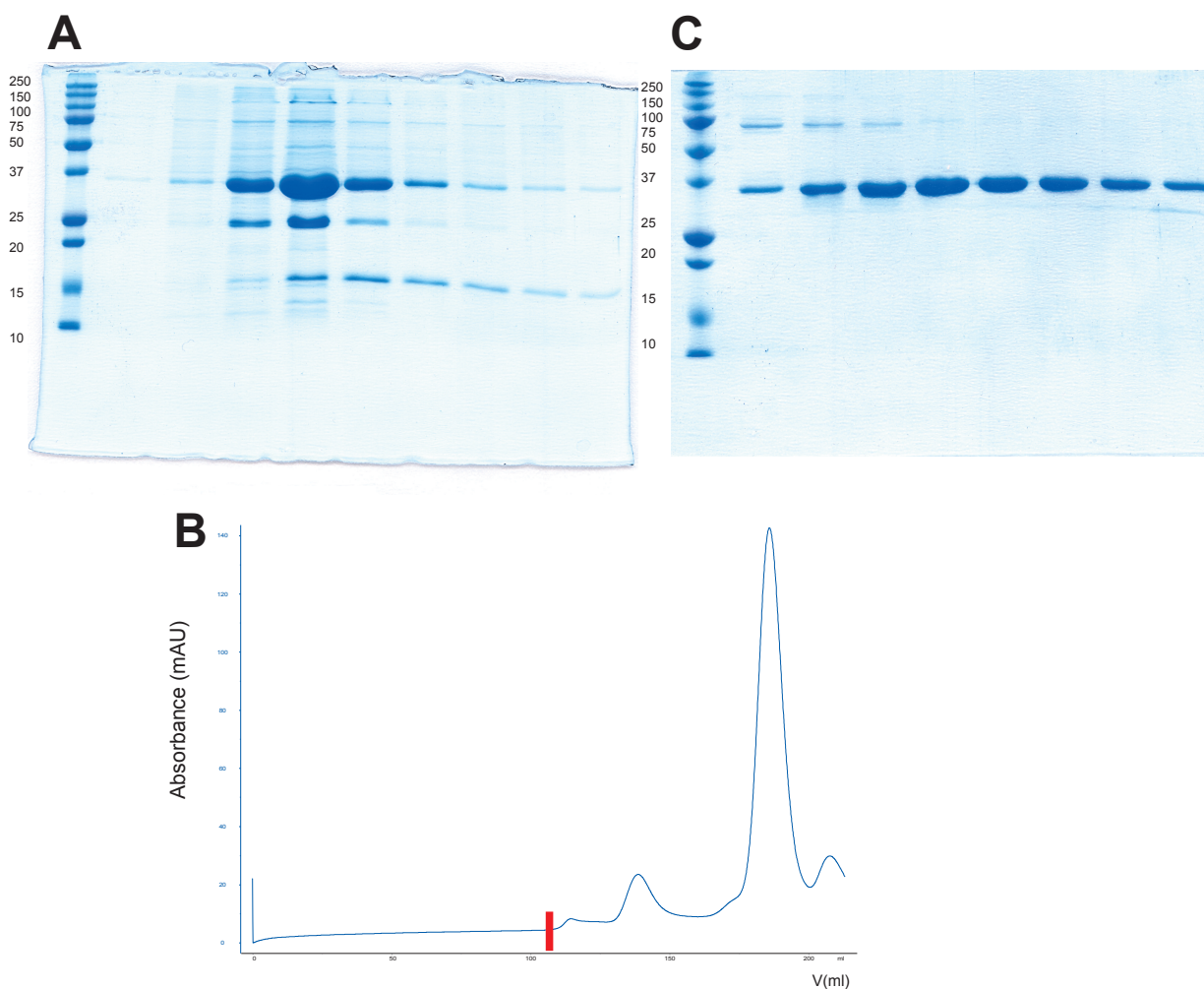
5.2 Komplex mezi ASK1-CD a proteinem 14-3-3

5.2.1 Expres a purifikace

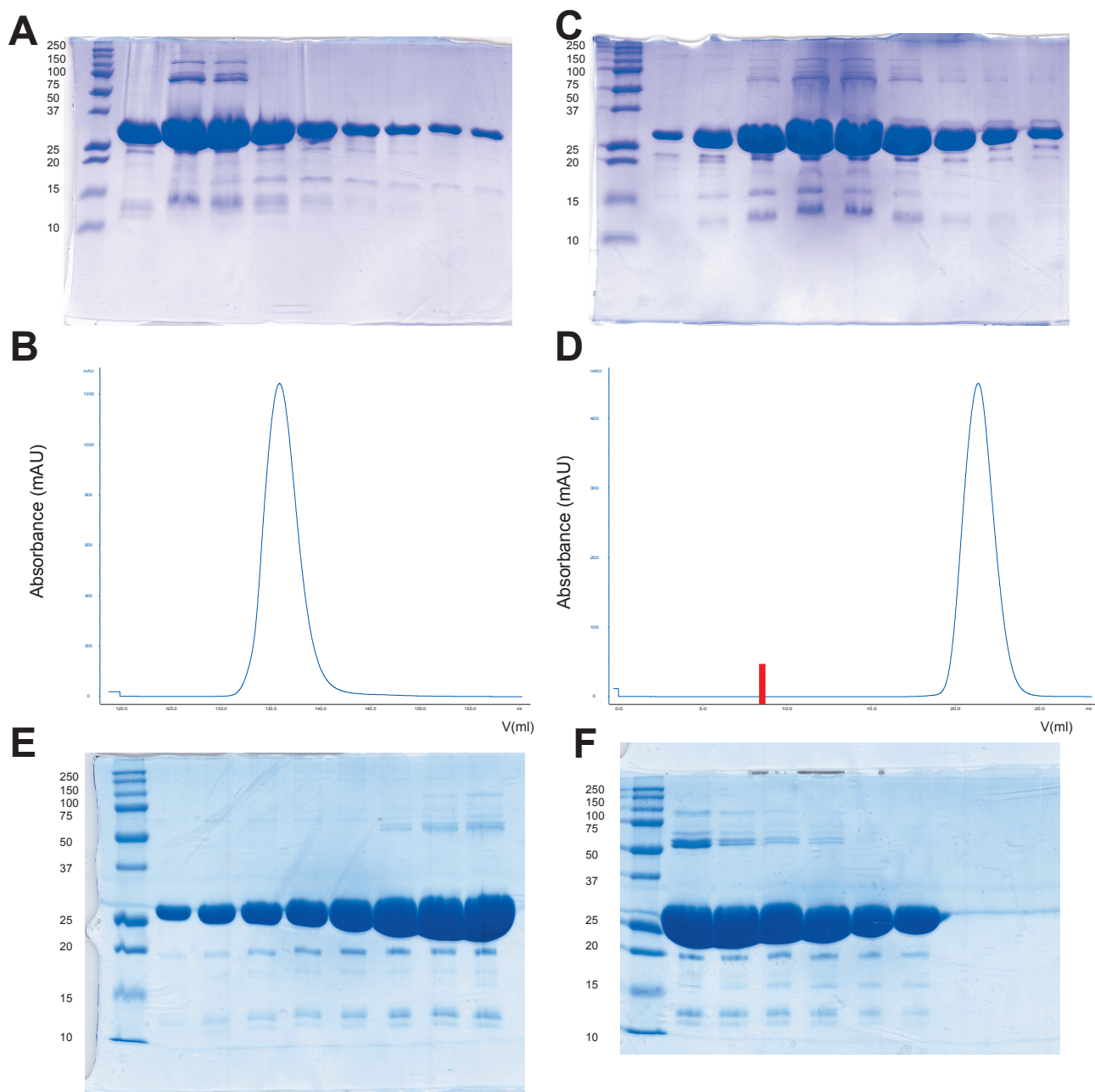
Kinasová doména ASK1 je jediná část celé molekuly ASK1, k níž jsou dostupné strukturální informace. Na základě konstruktů, který byl vykrytalizován (659 – 951 v sekvenci lidské ASK1) a jeho struktura rozřešena (Bunkoczi et al., 2007) a rovněž na základě predikované sekundární struktury pomocí programu PSIPRED (Jones et al., 1999) byl navrhnout nový podobný konstrukt, který by vyhovoval potřebě studia interakce s proteinem 14-3-3. Tento konstrukt začínal 659. aminokyselinou a končil 979. Kromě kinasové domény samotné tedy obsahoval na C-konci přesah, který v krystalové struktuře není zahrnut a obsahuje vazebné místo pro protein 14-3-3. Vazebné místo bylo bodovou mutagenézou upraveno pro potřeby fosforylace pomocí komerční PKA (viz strana 45). Tento konstrukt je v práci označován jako ASK1-CD. Celý byl exprimován v expresním systému pST39 v *Escherichia coli* BL21(DE3) zbytkovou bazální expresí s C-koncovou histidinovou kotvou. Purifikace proběhla ve dvou krocích. Po niklové chelatační chromatografii následovala gelová permeační chromatografie s ověřením čistoty a integrity proteinu mezi kroky podle postupu uvedeného na straně 42 a 45 (viz obr. 19, strana 79). Při úvodních experimentech byla mezi niklovou chelatační chromatografií a gelovou permeační chromatografií vyzkoušena i aniontová výměnná chromatografie, avšak ASK1-CD vykazovala i v pufru o pH 8,5 pouze minimální známky navázání na iontoměnič i když je její teoretické pI rovno 6 (výsledek neuveden). Výsledný výtěžek se pohyboval okolo 1-1,5 mg ASK1-CD na 1 l expresní kultury a měl dostatečnou čistotu pro další experimenty (viz obr. 19C, strana 79). Fosforylace

ASK1-CD na serinu 967 pomocí komerční PKA byla ověřena hmotnostně spektrometrickou analýzou (LC-MS/MS, výsledek neuveden), kde byla potvrzena >95% míra fosforylace vazebného motivu pro 14-3-3. Reziduální ATP po fosforylaci bylo odstraněno dialýzou.

Protein 14-3-3 ζ i jeho forma se zkrácením na C-konci 14-3-3 ζ Δ C byly exprimovány v *Escherichia coli* BL21(DE3), purifikovány niklovou chelatační chromatografií, aniontovou výměnnou chromatografií a nakonec gelovou permeační chromatografií s ověřením čistoty a integrity proteinu mezi kroky pomocí 12% (w/w) SDS-PAGE (viz obr. 20ACEF, strana 80). Průměrný výtěžek se pohyboval okolo 10 mg na 1 l expresní kultury a měl dostatečnou kvalitu pro další experimenty. Pro přípravu komplexu ASK1-CD:14-3-3 byly oba proteiny (ASK1-CD fosforylovaná pomocí PKA) smíchány dohromady a inkubovány 30 minut při teplotě laboratoře.



Obr. 19: Souhrn purifikace ASK1-CD (teoretická relativní molekulová hmotnost 36500). A) SDS-PAGE (12%, w/w) po niklové chelatační chromatografii. Eluce probíhala pomocí pufru s 300mM imidazolem. Frakce obsahující protein byly po odebrání alikvotu na elektroforetickou analýzu ihned spojeny, byla k nim přidána TEV proteasa pro odštěpení C-koncové histidinové kotvy a dialyzovány přes noc při 4 °C. B) Chromatogram po gelové permeční chromatografii, červená značka označuje mrtvý objem kolony. Frakce byly v případě použité kolony "hiloadd" Superdex 26/600 sbírány po 1ml s průtokem 2 ml/min v pufru 50mM Tris-HCl pH 8, 200mM NaCl, 2mM EDTA, 5mM dithiotreitol. C) SDS-PAGE (12%, w/w). Vzorky jednotlivých frakcí (každé druhé) z gelové permeční chromatografie obsahující podle chromatogramu ASK1-CD potvrzují přijatelnou čistotu připravovaného proteinu. Popisky u standardu relativní molekulové hmotností na SDS-PAGE jsou uvedeny v tisících.



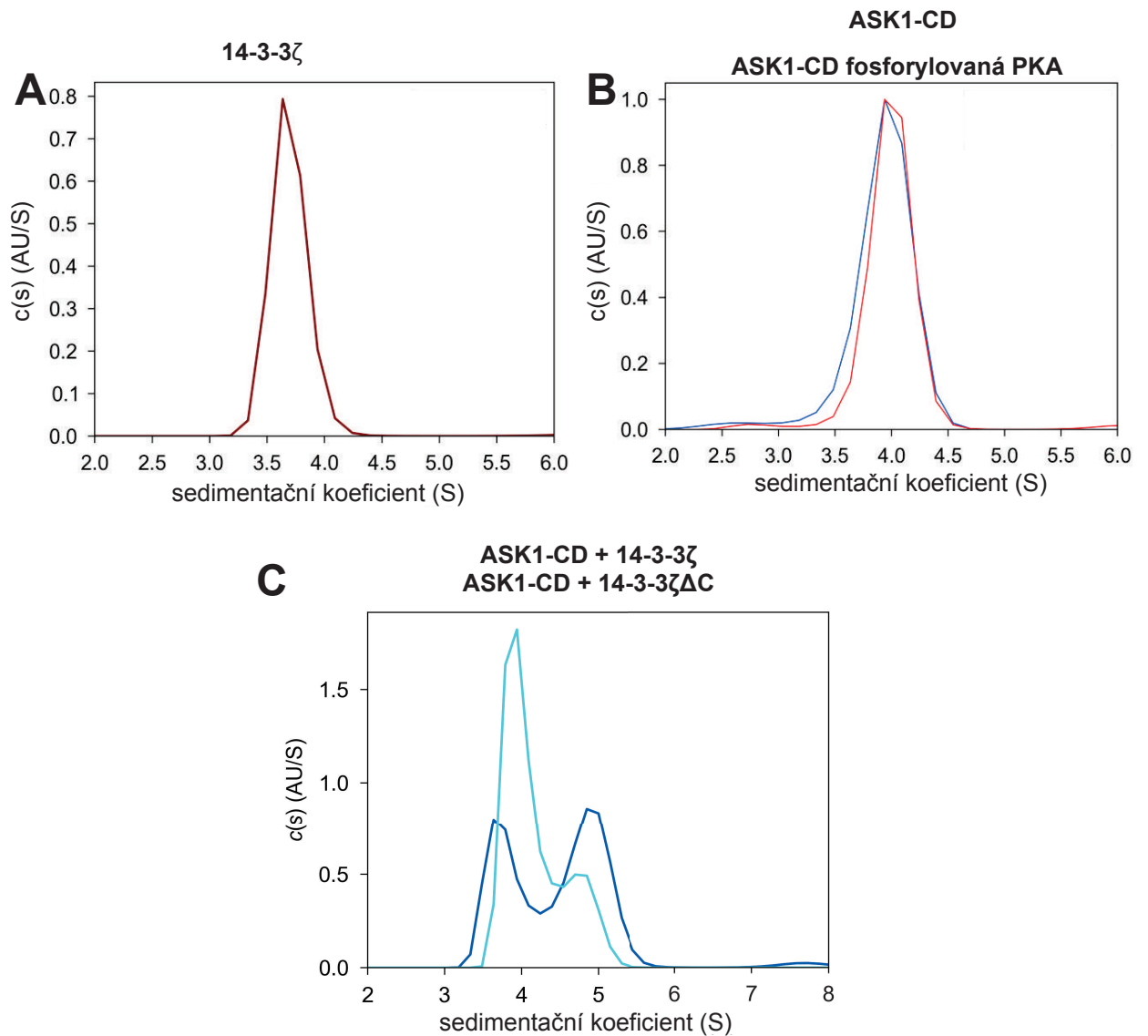
Obr. 20: Souhrn purifikace 14-3-3 ξ (teoretická relativní molekulová hmotnost 29908). A) SDS-PAGE (12%, w/w) po niklové chelatační chromatografii. Eluce probíhala pomocí pufru s 300mM imidazolem. Frakce obsahující protein byly spojeny a dialyzovány. B) Chromatogram po aniontové výměnné chromatografii s elucí puftrem 50mM Tris-HCl, 5mM dithiotreitol a s gradientem NaCl od 10 do 1000mM v rozmezí 30 min. Uvedený chromatogram začíná v počátku gradientu NaCl. Frakce s proteinem byly po odebrání alikvotu k elektroforetické analýze spojeny. C) SDS-PAGE (12%, w/w) frakcí s proteinem po aniontové výměně. D) Chromatogram po gelové permeační chromatografii, červená značka označuje mrtvý objem kolony. Frakce byly v případě použité kolony Superdex 26/600 sbírány po 1 ml s průtokem 2 ml/min v pufru 20mM Tris, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 5mM dithiotreitol. E, F) SDS-PAGE (12%, w/w) jednotlivých frakcí z gelové permeační chromatografie obsahující podle chromatogramu 14-3-3 ξ potvrzující přijatelnou čistotu připravovaného proteinu. Mutant 14-3-3 $\zeta\Delta C$ byl purifikován analogickým způsobem. Popisky u standardu relativní molekulové hmotnosti na SDS-PAGE jsou uvedeny v tisících.

5.2.2 Sedimentační analýza ASK1-CD a proteinu 14-3-3

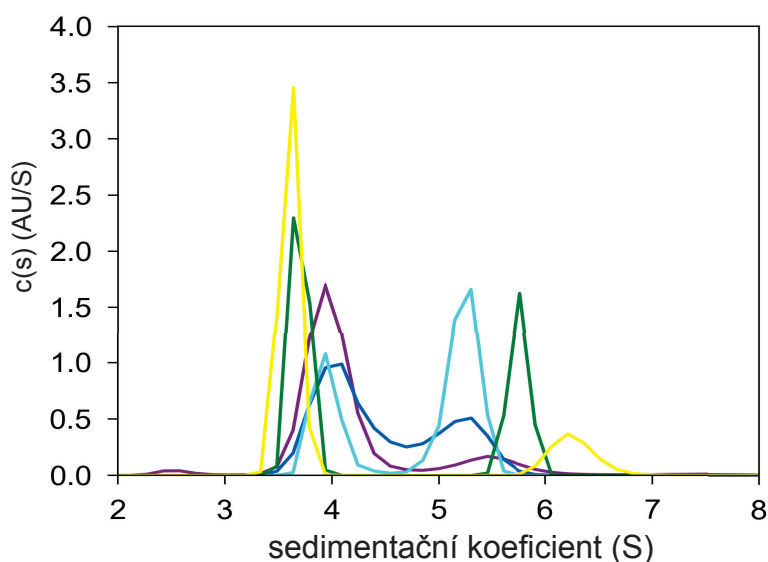
Po úspěšné purifikaci ASK1-CD a 14-3-3 ζ byla provedena analýza jejich sedimentačních vlastností analytickou ultracentrifugací, včetně sedimentačních vlastností komplexu. Měření sedimentační rychlosti bylo provedeno při 42000 otáčkách za minutu za redukčních podmínek v pufru s 2mM β -merkaptoethanolem. K akvizici dat byla použita absorpční optika při 280 nm v měřicí cele s optickou dráhou 1,2 cm. Normalizované kontinuální distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ vypočítané z měření sedimentační rychlosti částic odhalily, že samotný protein 14-3-3 ζ má sedimentační koeficient $s_{(20,w)} = 3,7$ S odpovídající relativní molekulové hmotnosti 58000. Tato vypočítaná hodnota je v souladu s teoretickou hmotností dimerního 14-3-3 ζ 59800 jak bylo očekáváno (viz obr. 21A, strana 83). Dimer též musí mít velice nízkou K_d , protože v datech je $c(s)$ odpovídající monomeru (1,5-2 S) rovno nule a ve vzorku tedy pravděpodobně není za dané použité 10 μ M koncentrace vůbec přítomen. Z dat je též zřejmé, že $s_{(20,w)}$ pro ASK1-CD se pohybuje okolo 4,0 S, monomer stejně jako v předchozím případě není přítomen. Vypočítaná relativní molekulová hmotnost 66000 přibližně odpovídá teoretickým 72000 pro dimer ASK1-CD, jak bylo očekáváno. Sedimentační koeficient se rovněž po fosforylaci proteinu pomocí komerční PKA nezmění, pro experimenty s vazbou na 14-3-3 ζ tak mohl být používán fosforylovaný protein (viz obr. 21B, strana 83). Sedimentační koeficient komplexu se dlouho nepodařilo spolehlivě určit, neboť v závislosti na použitých koncentracích při molárním poměru ASK1-CD ku 14-3-3 ζ 1:1 byla pozorována jeho změna mezi 4-5 S. To neodpovídalo žádné představě o jeho možném složení, naopak to indikovalo pravděpodobnou slabou vazbu s $K_d > 10\mu$ M s tím, že zdánlivě nižší sedimentační koeficient odrážel dynamickou rovnováhu v časové škále experimentu. Dalšími experimenty bylo zjištěno, že absence C-koncové flexibilní části 14-3-3 ζ je síla interakce zvýšena (viz obr. 21C, strana 83). Pro všechny další vazebné experimenty s katalytickou doménou ASK1-CD byl tedy používán 14-3-3 $\zeta\Delta$ C.

Jako další experiment pro rozluštění složení komplexu byla studována tvorba komplexu při různých poměrech ASK1-CD ku 14-3-3 $\zeta\Delta$ C (10:1, 3:1, 1:1, 1:3 a 1:9) s konstantní koncentrací ASK1-CD 18 μ M s předpokladem slabé vazby okolo $K_d = 10\mu$ M. Měření sedimentační rychlosti proběhlo při 42000 otáčkách za minutu, akvizice dat s absorpční optikou. Vzhledem k tomu, že absorbance v měřicí kyvetě byla

již u poměrů 1:3 a 1:9 vyšší než 1, byly tyto dva poměry měřeny při 250 nm, v případě poměru 1:9 musela být dokonce použita měřící cela s optickou dráhou 0,3 cm. Molární absorpční koeficienty pro ASK1-CD i 14-3-3 ζ Δ C pro tuto vlnovou délku byly změřeny empiricky spektrofotometrem, pohybovaly se přibližně na jedné třetině hodnoty molárního absorpčního koeficientu pro 280nm (7700 M⁻¹cm⁻¹ pro 14-3-3 ζ i 14-3-3 ζ Δ C, 14200 M⁻¹cm⁻¹ pro ASK1-CD). Ze získaných $c(s)$ distribucí (viz obr. 22, stran 84) je zřejmé, že sedimentační koeficient $s_{(20,w)}$ pro komplex roste až k hodnotě 6,2 S. Toto bylo ověřeno i měřením sedimentační rychlosti za stejných podmínek i při poměru ASK1-CD ku 14-3-3 ζ Δ C 1:20, kde komplex měl též sedimentační koeficient 6,2 S (výsledek neuveden). Tato hodnota odpovídá relativní molekulové hmotnosti částice 120000 a tedy přibližně stechiometrii 2:2, tedy, že dimer 14-3-3 ζ Δ C váže dimer ASK1-CD (teoretická hodnota relativní molekulové hmotnosti je 129600) . Pro zjištění vazebné afinity, K_d , byly výsledné $c(s)$ distribuce s měnicemi se koncentracemi 14-3-3 ζ Δ C vyhodnoceny pomocí přímého globálního modelování Lammových rovnic v programu SEDPHAT. Hodnota K_d byla určena na $(4 \pm 2)\mu\text{M}$ za použití reverzibilního vazebného modelu $A + B \rightleftharpoons AB$ se stechiometrii 2:2, kdy proteiny byly považovány za pevné nedisociující dimery. Metoda výnosu sedimentačních vazebných izoterem, zde nemohla být použita, neboť data byla kombinována z experimentů při různých vlnových délkách a optických drahách a modely, které se pro ně používají, neumožňují v programu SEDPHAT nastavení takového množství rozdílných parametrů mezi experimenty. Hodnota K_d odpovídá v souvislosti s protein-proteinovými interakcemi slabé transientní vazbě. Sedimentační koeficient komplexu vysoce závisí na výchozích koncentracích, což indikuje velmi dynamickou rovnovážnou interakci v časové škále experimentu.



Obr. 21: Sedimentační analýza analytickou ultracentrifugací. A) $c(S)$ distribuce 14-3-3 ζ ($s_{(20,w)}=3,7$ S, 30 μ M) B) Porovnání $c(S)$ distribuce ASK1-CD ($s_{(20,w)} = 4,0$ S, 25 μ M) nefosforylované (modře) a fosforylované pomocí komerční PKA (červeně). C) Porovnání komplexu ASK1-CD se 14-3-3 ζ a 14-3-3 ζ Δ C v poměru 1:1 při koncentraci každého z proteinů 18 μ M.



Obr. 22: Sedimentační analýza, koncentrační série s konstantní koncentrací ASK1-CD ($18\mu\text{M}$) a proměnlivé 14-3-3 ζ Δ C ($1,8 - 162\mu\text{M}$). V přítomnosti $162\mu\text{M}$ 14-3-3 ζ Δ C (žlutá distribuce) je v datech přítomná komponenta 6,2 S odpovídající relativní molekulové hmotnosti 120000, což odpovídá stechiometrii komplexu 2:2. Pomocí přímého modelování v programu SEDPHAT byla určena zdánlivá disociační konstanta komplexu na $(4 \pm 2)\mu\text{M}$.

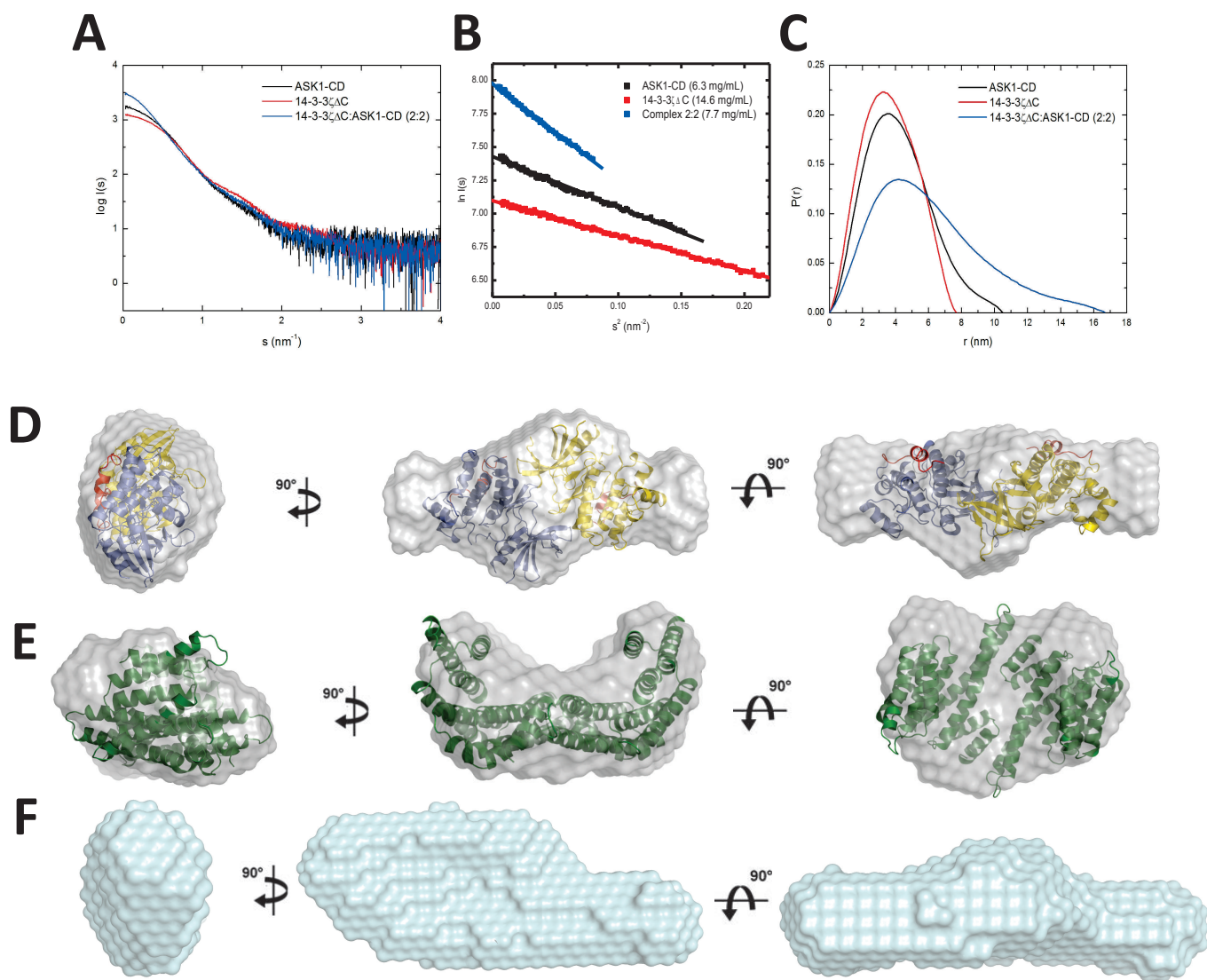
5.2.3 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření

Pro lepší pochopení mechanismu vazby a získání strukturního pohledu do této důležité interakce ASK1-CD a 14-3-3 ζ Δ C byl naměřen SAXS pro samotné proteiny 14-3-3 ζ Δ C, ASK1-CD a potom pro jejich vzájemný komplex. Tato metoda byla zvolena hlavně s ohledem na zjištění z analytické ultracentrifugace, že daná interakce má v roztoku přednostně transientní a dynamický charakter a původně plánované krystalizační experimenty by tedy pravděpodobně byly dlouhé, nákladné a s mizivou pravděpodobností na úspěch.

Kvalita experimentálních dat (viz obr. 23A, strana 86), primárně absence agregovaného proteinu, byla ověřena linearitou Guinierova výnosu v oblasti jeho platnosti pomocí programu GNOM (viz obr. 23B, strana 86). Zdánlivé relativní molekulové hmotnosti ASK1-CD, 14-3-3 ζ Δ C i komplexu byly odhadnuty porovnáním přímé intenzity rozptylu vzorku $I(0)$ s hodnotou pro referenční hovězí sérový albumin (viz tabulka 3, strana 87). Zjištěná relativní molekulová hmotnost 111000 pro komplex je v dobrém souladu s předpokladem vazebné stechiometrii 2:2 (teoretická hodnota pro

dimer:dimer ASK1-CD a 14-3-3 ζ Δ C je 129600) a je i v souladu s výsledky z analytické ultracentrifugace. Hodnoty gyračních poloměrů R_g z Guinierova výnosu i kalkulované z funkce meziatomárních vzdáleností $p(r)$ též ukazují, že se jedná o kompaktní ale vysoce asymetrickou částici oproti samotným proteinům. Tento fakt byl potvrzen i průběhem $p(r)$ funkce, která udává hodnotu D_{max} samotné ASK1-CD 104 Å, 14-3-3 ζ Δ C 76 Å, zatímco pro komplex byla tato hodnota stanovena signifikantně výše na 166 Å (viz obr. 23C, strana 86). Prokazuje to tedy taktéž protáhlý a asymetrický tvar částice komplexu.

Model rozptylové obálky, která odráží tvar proteinu, byla vypočítána *ab initio* za pomoci programů DAMMIN a DAMAVER z rozptylových dat. Rekonstruované tvary se skládaly z průměru nejméně deseti individuálních rekonstrukcí, které však mezi sebou z porovnání prostorové rozdílnosti nevykazovaly výraznější nesoulad. Obálka pro samotnou ASK1-CD (viz obr. 23D, strana 86) vykazuje mohutnější centrální oblast, do níž velikostně i tvarově přesně zapadá publikovaná dimerní krystalová struktura, s dvěma menšími oblastmi po straně, které pravděpodobně náleží flexibilnějším C-koncovým částem proteinu a které krystalová struktura postrádá. Obálka 14-3-3 ζ Δ C naopak přesně vystihuje tvar i velikost plynoucí ze známé krystalové struktury tohoto dimeru včetně charakteristické kavity, do níž se váží substráty 14-3-3 (viz obr. 23E, strana 86). Rozptylová obálka komplexu ASK1-CD:14-3-3 ζ Δ C má oproti samotné ASK1-CD v jednom směru daleko více asymetrický tvar, přičemž je i na jedné straně výrazně objemnější. Tato obálka bohužel neposkytuje jednoznačnou odpověď na složení a strukturu komplexu, existují dvě možná vysvětlení, která jsou si z pohledu odchylky od experimentálních dat rovnocenná (viz obr. 24AB, strana 87). Za prvé je možné, že ASK1-CD váží 14-3-3 ζ Δ C přes relativně malé rozhraní tak, že oba proteiny zůstávají v dimerním stavu, přičemž mezi sebou interaguje pouze jeden monomer od každého proteinu. Za druhé, dva separátní monomery ASK1-CD se váží na dimer 14-3-3 ζ Δ C každý z jiné strany a možná i s jinou vazebnou afinitou. Teoretické rozptylové křivky od obou modelů jsou statisticky ve shodě s experimentálními daty a bude třeba více biofyzikálních experimentů s finálnímu rozřešení tohoto komplexu.



Obr. 23: Strukturální charakterizace ASK1-CD a jejího komplexu s 14-3-3 $\zeta\Delta$ C pomocí SAXS. A) Intenzita rozptylu jako funkce rozptylového vektoru s ($s = 4\pi\sin(\theta)/\lambda$, kde 2θ je úhel rozptylu a λ vlnová délka). B) Guinierův výnos ASK1-CD (6,3 mg/ml), 14-3-3 $\zeta\Delta$ C (14,6 mg/ml) i komplexu ASK1-CD:14-3-3 $\zeta\Delta$ C (7,7 mg/ml). C) Distribuce meziatomárních vzdáleností $p(r)$. D) Zprůměrované vypočítané obálky z programu DAMMIN pro samotnou ASK1-CD s vloženým modelem krystalové struktury. Okrajové oblasti, které nelze touto strukturou vysvětlit pravděpodobně obsahují C-terminální segment se 14-3-3 vazebným motivem, který v krystalové struktuře nebyl zahrnut. E) Zprůměrované vypočítané obálky z programu DAMMIN pro 14-3-3 $\zeta\Delta$ C s vloženým modelem krystalové struktury. F) Zprůměrované vypočítané obálky z programu DAMMIN pro komplex ASK1-CD:14-3-3 $\zeta\Delta$ C.

Tabulka 3: Strukturní parametry ASK1-CD a 14-3-3ζΔC určené ze SAXS

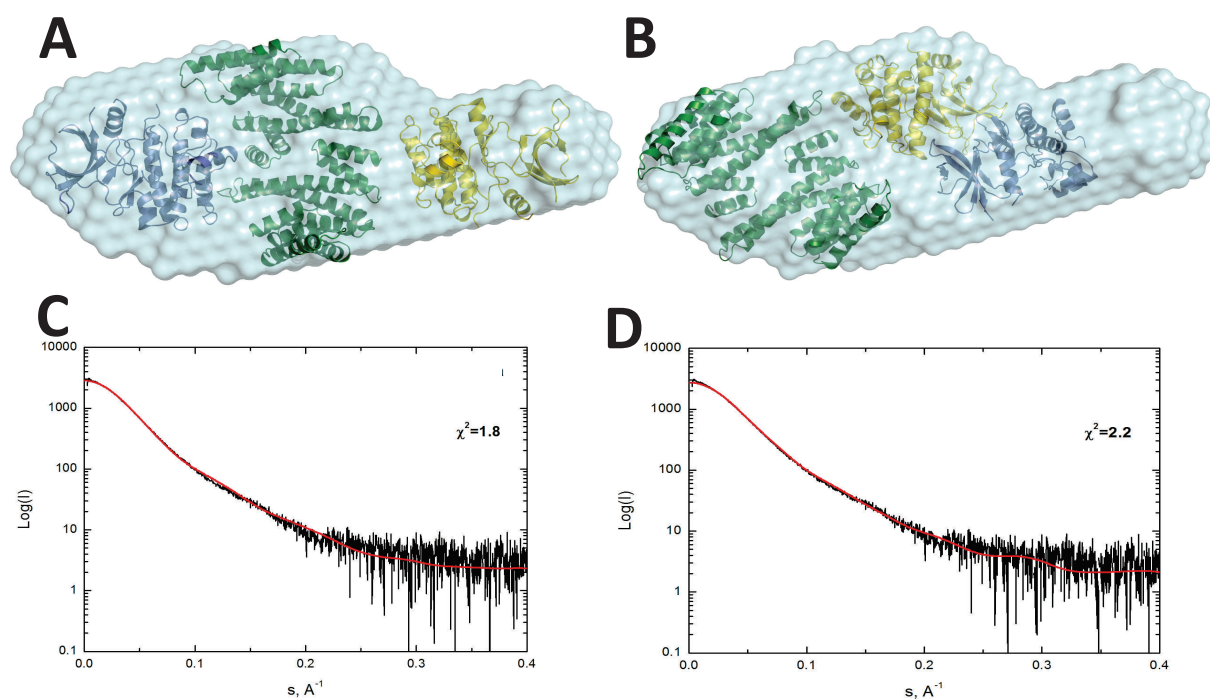
Vzorek	R_g^a (Å)	R_g^b (Å)	$M_{rI(0)}^c$	D_{\max}^d (Å)
ASK1-CD	$33,7 \pm 0,1$	$32,7,2 \pm 0,1$	63000	104
14-3-3ζΔC	$28,1 \pm 0,1$	$28,1 \pm 0,1$	46000	76
ASK1-CD:14-3-3ζΔC	$48,1 \pm 0,2$	$48,3 \pm 0,1$	111000	166

^a Určeno Guinierovou aproximací

^b Určeno z $p(r)$ funkce

^c Určeno srovnáním počáteční intenzity rozptylu $I(0)$ s referenčním hovězím sérovým albuminem.

^d Určeno nepřímou Fourierovou transformací s experimentálních dat.



Obr. 24: Ukázka superimpozice krystalových struktur (provedeno prof. RNDr. Tomášem Obšilem, Ph.D) ASK1-CD (žlutě + modře) a 14-3-3ζΔC (zeleně) do rozptylové obálky ASK1-CD:14-3-3ζΔC získané pomocí SAXS. A) Model, kdy se na dimer 14-3-3ζΔC váží monomery ASK1-CD na dvě různá místa. B) Model interakce dimeru 14-3-3ζΔC s dimerem ASK1-CD. C,D) Modely z A (C) a B (D) jsou podle hodnoty χ^2 v dobré shodě s experimentálními daty (černě). Teoretické rozptylové křivky (červeně) superimponovaných podjednotek byly získány pomocí programu CRYOSOL.

5.3 Fosducin a protein 14-3-3

5.3.1 Exprese a purifikace

Všechny konstrukty pro různé regiony fosducinu (1-246 Pdc, 1-107 Pdc-ND, 110-246 Pdc-CD) byly exprimovány v *Escherichia coli* BL21(DE3) pomocí T7 expresního systému s N-terminální histidinovou kotvou. Protože fosducin obsahuje dva strukturně odlišné regiony, N-koncový vysoce flexibilní, který nese vazebná místa pro 14-3-3 ζ a C-koncový, který má kompaktní globulární strukturu, byly tyto rozdílné oblasti za účelem pochopení mechanismu interakce exprimovány separátně. Purifikace ve všech případech proběhla ve třech krocích podle postupu na stranách 42 a 47. Po niklové chelatační chromatografii pokračovala aniontová výměnná chromatografie a gelová permeační chromatografie s ověřením integrity a čistoty vzorku pomocí SDS-PAGE byla zařazena jako poslední krok. Výsledný vzorek měl dostatečnou kvalitu a čistotu pro další analýzu interakce. Průměrný výtěžek se u konstruktů Pdc pohyboval okolo 2,5 mg na 1 l expresní kultury, u Pdc-ND byl okolo 0,5 mg na 1 l expresní kultury a u Pdc-CD 1 mg na 1 l expresní kultury v dostatečné kvalitě (výsledky purifikací neuvedeny). Míra fosforylace vazebných motivů pomocí komerční PKA byla ověřena hmotnostně spektrometrickou analýzou (LC-MS/MS, výsledek neuveden), kde byla potvrzena 100% míra fosforylace v obou případech jak u Pdc tak i Pdc-ND.

Protein 14-3-3 ζ Δ C, který byl používán pro studium interakcí s fosducinem podle předchozích publikací zabývajících se vazbou fosducinu na 14-3-3 ζ (Rezabkova et al., 2013) byl izolován stejným postupem jako u komplexu ASK1-CD (viz strana 42 a 45).

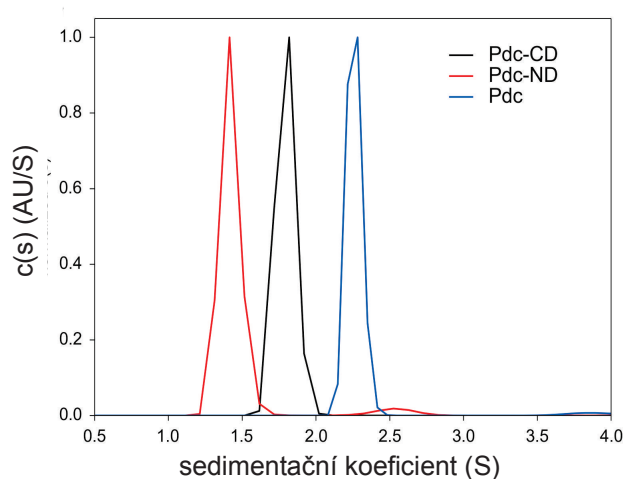
5.3.2 Sedimentační analýza komplexu fosducinu a proteinu 14-3-3

Pro kontrolu čistoty a oligomerních stavů proteinů bylo provedeno měření sedimentačních rychlostí vypurifikovaných proteinů. Pro tyto účely byla použita analytická ultracentrifugace, za redukčních podmínek v pufru s 2mM β -merkaptoethanolem při 48000 otáčkách za minutu s akvizicí dat absorpční optikou. Normalizované kontinuální distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ vypočítané z měření sedimentační rychlosti částic odhalily, že samotný Pdc má sedimentační

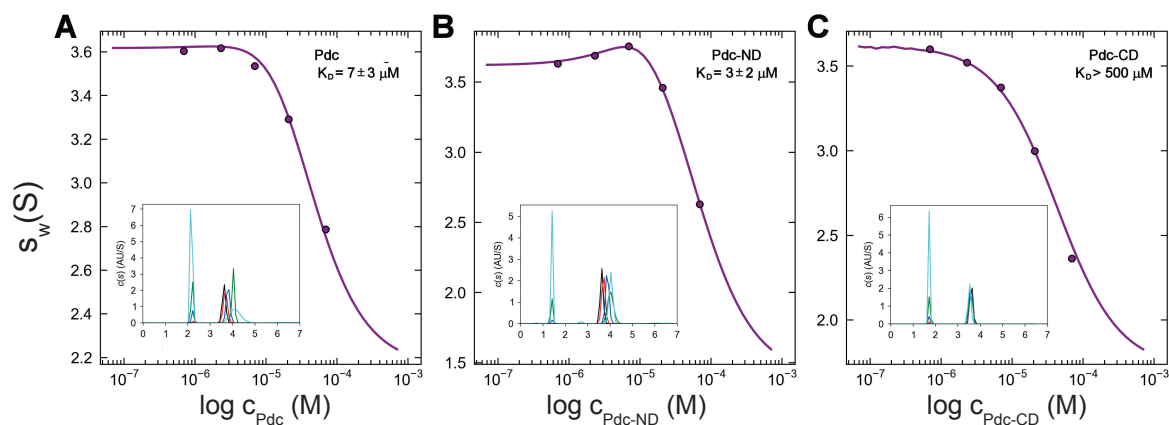
koeficient $s_{(20,w)} = 2,4$ S s odpovídající relativní molekulovou hmotností 31800, Pdc-ND má $s_{(20,w)} = 1,5$ S (relativní molekulová hmotnost 14400) a Pdc-CD má $s_{(20,w)} = 1,8$ S (relativní molekulová hmotnost 18700). Všechny tyto hmotnosti odpovídají teoretickým relativním molekulovým hmotnostem vypočítaným z primární struktury (pro Pdc 30160, Pdc-ND 14700 a Pdc-CD 17410) a tedy napovídají, že se jedná v roztoku o monomery, což v případě Pdc bylo prokázáno již v předchozích publikacích (Rezabkova et al., 2013). Rovněž bylo zjištěno, že komplex Pdc:14-3-3 ζ Δ C vykazuje stechiometrii 1:2, tedy že na jeden protein fosducinu se váže dimer 14-3-3 ζ Δ C jak by se dalo očekávat na základě přítomnosti dvou vazebných míst pro 14-3-3 na N-koncové části fosducinu (viz obr. 25, strana 90).

Pro pochopení mechanismu a funkce vazby 14-3-3 ζ na fosducin a lokalizace celkového interakčního rozhraní byly určeny zdánlivé disociační konstanty pro interakci všech třech konstruktů s 14-3-3 ζ Δ C. K jejich analýze byla opět použita analytická ultracentrifugace, metoda měření sedimentačních rychlostí, při 48000 otáčkách za minutu s akvizicí dat absorpční optikou. Pro každý konstrukt Pdc byla připravena koncentrační série s konstantní koncentrací 14-3-3 ζ Δ C 14 μ M a měnící se koncentrací Pdc od 0,7 - 70 μ M (20:1, 6:1, 2:1, 2:3, 1:5). První vyhodnocení dat po získání $c(s)$ distribucí bylo provedeno metodou analýzy vazebné izotermy celkového sedimentačního koeficientu s_w získaného integrací celé $c(s)$ distribuce. s_w bylo vyneseno do grafu jako funkce měnící se koncentrace odpovídající formy fosducinu a proložena vazebným modelem, jež předpokládá stechiometrii reverzibilní vazby 14-3-3 ζ Δ C:Pdc 2:1 a kde 14-3-3 ζ Δ C byl pokládán za pevný nedisociující dimer. K_d pro Pdc byla stanovena jako parametr vazebné izotermy získaný nelineární regresí a jeho hodnota byla stanovena na $(7 \pm 3)\mu$ M (viz obr. 26A, strana 90), pro Pdc-ND na $(3 \pm 2)\mu$ M (viz obr. 26B, strana 90) a pro Pdc-CD bylo možno pouze určit, že je vyšší než 0,5mM s neurčitelnou horní hranicí (viz obr. 26C, strana 90). Výsledek analýzy vazebné izotermy s_w byl verifikován přímým modelováním Lammových rovnic v programu SEDPHAT (výsledek neuveden). Vynikající kvalita navrženého modelu potvrzuje vaznou stechiometrii 2:1, určené zdánlivé disociační konstanty ukazují, že N-koncová část fosducinu se na 14-3-3 ζ Δ C váže mírně silněji než fosducin celý. C-koncová doména má však K_d tak vysokou, že za biologických podmínek by vazba pravděpodobně vůbec nenastávala. To naznačuje, že pro stabilitu komplexu Pdc:14-3-3 ζ Δ C má N-koncová fosforylačně závislá interakce zásadní důležitost. Díky zvýšené afinitě 14-3-3 ζ Δ C pro separovanou N-koncovou část Pdc

v porovnání s celým fosducinem se lze také domnívat, že C-koncová část může vazbě do jisté míry i stéricky bránit, neboť z dalších fluorescenčních experimentů provedených na tomto systému plyne, že obě tyto části v proteinu mezi sebou interagují též (Kacirová et al., 2015).



Obr. 25: Normalizované distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ pro celý fosducin (Pdc, modře, $s_{(20,w)}=2,4$ S), N-terminální část fosducinu (Pdc-ND, červeně, $s_{(20,w)}=1,5$ S) a C-terminální část fosducinu (Pdc-CD, černě, $s_{(20,w)}=1,8$ S)



Obr. 26: Analytická ultracentrifugace - měření sedimentační rychlosti. Vážené průměry sedimentačních koeficientů byly vypočítány na základě $c(s)$ distribucí uvedených vždy ve vložených grafech. Zdánlivá disociační konstanta byla určena nelineární regresí z experimentálních dat. A) Izoterma vážených průměrů sedimentačních koeficientů $c(s)$ v závislosti na koncentraci Pdc ($0,7-70\mu\text{M}$) s konstantní koncentrací 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ ($14\mu\text{M}$). B) Izoterma vážených průměrů sedimentačních koeficientů $c(s)$ v závislosti na koncentraci Pdc-ND ($0,7-70\mu\text{M}$) s konstantní koncentrací 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ ($14\mu\text{M}$). C) Izoterma vážených průměrů sedimentačních koeficientů $c(s)$ v závislosti na koncentraci Pdc-CD ($0,7-70\mu\text{M}$) s konstantní koncentrací 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ ($14\mu\text{M}$).

5.4 *Nth1* + *Bmh1*

5.4.1 Exprese a purifikace

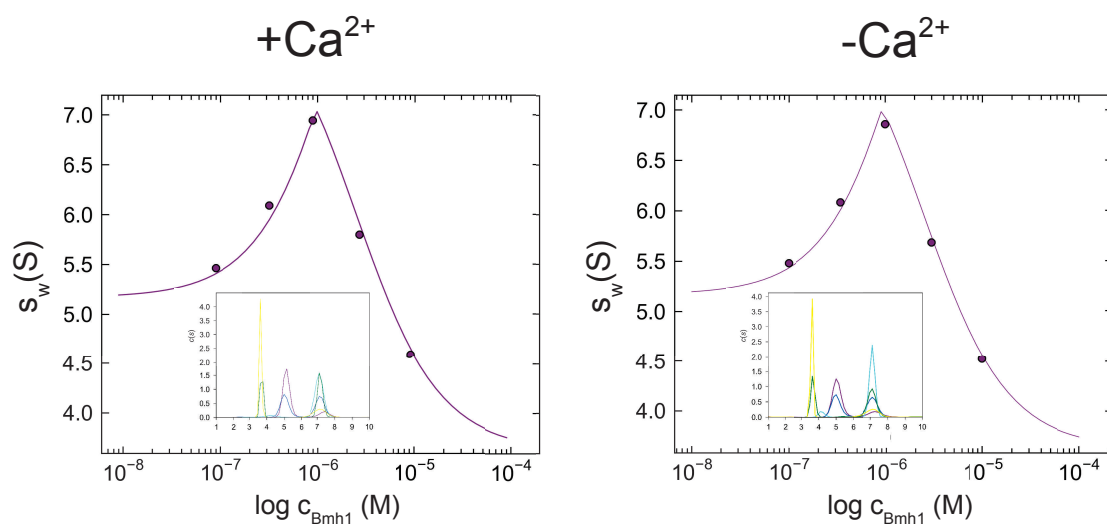
Neutrální trehalasa 1 byla exprimována v T7 expresním systému v *Escherichia coli* BL21(DE3) kmenu „Rosetta“ s N-terminální histidinovou kotvou a fúzním thioredoxinem pro zvýšení rozpustnosti. Purifikace byla provedena niklovou chelatační chromatografií následované odštěpením histidinové kotvy a fúzního proteinu. Dále bylo pokračováno kationtovou výměnnou chromatografií a gelovou permeační chromatografií s ověřením integrity a čistoty výsledného vzorku pomocí SDS-PAGE podle postupu na straně 42 a 48. Průměrný výtěžek *Nth1* činil 1 mg proteinu na 1 l expresní kultury a měl dostatečnou čistotu na další experimenty (výsledky purifikace neuvedeny). Míra fosforylace vazebných motivů pomocí komerční PKA byla ověřena hmotnostně spektrometrickou analýzou (LC-MS/MS, výsledek neuveden), kde byla potvrzena 100% míra fosforylace na obou vazebných místech.

Protein *Bmh1*, kvasničný analog lidského proteinu 14-3-3, který byl používán pro studium interakce s *Nth1*, byl izolován stejným způsobem jako lidská 14-3-3 ζ u komplexu s ASK1-CD (strana 42 a 45).

5.4.2 Sedimentační analýza, vliv vápníku na vazbu *Nth1* a *Bmh1*

Pro získání představy jak vazba vápníkových kationtů ovlivňuje vazbu *Bmh1* na *Nth1* a tedy její aktivity, byla studována sedimentační analýzou zdánlivá disociační konstanta K_d komplexu *Nth1*:*Bmh1* v přítomnosti i nepřítomnosti 10mM CaCl_2 . K jejich analýze byla opět použita analytická ultracentrifugace, metoda měření sedimentační rychlosti, při 48000 otáčkách za minutu s akvizicí dat za pomoci absorpční optiky. Sedimentační vlastnosti obou samotných proteinů i komplexu již byly touto metodou studovány, stechiometrie vazby byla stanovena na *Nth1*:*Bmh1* 1:2 se sedimentačními koeficienty *Bmh1*, *Nth1* a komplexu na 3,6 S, 5,1 S a 7.2 S. K_d byla určena v nepřítomnosti vápníku na $(0,15 \pm 0,1)\mu\text{M}$ pro přirozenou formu *Nth1*. (Veisová et al., 2012). Vzorek *Nth1* i *Bmh1* byl před samotným měřením dekalciifikován dialýzou proti pufru s 1mM chelatačním činidlem EGTA, které vápníkové ionty váže

preferenčně. Pro obě podmínky s i bez CaCl_2 byla připravena série měření s konstantní koncentrací Nth1 $1\mu\text{M}$ a měnící se koncentrací Bmh1 rozsahu od $0,2\text{--}20\mu\text{M}$ v poměrech Bmh1:Nth1 20:1, 6:1, 2:1, 2:5, 1:5. Pro nižší koncentrace než $0,2\mu\text{M}$ se absorpční optika analytické ultracentrifugy ukázala být již nedostatečně citlivá. První vyhodnocení dat po získání $c(s)$ distribucí bylo provedeno metodou analýzy vazebné izotermy celkového sedimentačního koeficientu s_w získaného integrací celé $c(s)$ distribuce. s_w bylo vyneseno do grafu jako funkce měnící se koncentrace Bmh1 a proložena vazebným modelem, jež předpokládal stechiometrii reverzibilní vazby Nth1:Bmh1 1:2 a kde Bmh1 byl pokládán za pevný nedisociující dimer (viz obr. 27, strana 93). K_d byla stanovena jako parametr vazebné izotermy získaný nelineární regresí a jeho hodnota byla stanovena v nepřítomnosti i přítomnosti 10mM CaCl_2 velice podobně s nejlepší určenou hodnotou 10nM , avšak 95% interval spolehlivosti zahrnoval celou škálu K_d nižší než 21nM . Výsledek analýzy vazebné izotermy s_w byl verifikován přímým modelováním Lammových rovnic v programu SEDPHAT (výsledek neuveden). Měření je tedy s ohledem na výsledné hodnoty a hlavně použité počáteční koncentrace mimo možnosti detekce této metody a přesné určení nebylo možné. Mezi podmínkami se však 95% interval spolehlivosti nemění. Pokud se vazebná afinita mění, tak pouze nepatrně pod rozlišovací schopnosti AUC. Zvýšená aktivita Nth1 v přítomnosti Bmh1 a Ca^{2+} v porovnání s přítomností samotného Bmh1 tedy nemůže být dobře vysvětlena změnami vazebné afinity Bmh1 k Nth1 v závislosti na přítomnosti vápenatých iontů.



Obr. 27: Analytická ultracentrifugace - měření sedimentační rychlosti. Vážené průměry sedimentačních koeficientů byly vypočítány na základě $c(s)$ distribucí uvedených vždy ve vložených grafech. Zdánlivá disociační konstanta byla určena nelineární regresí z experimentálních dat. V obou případech jak s koncentrací CaCl₂ 10mM tak bez vápníku byla ve všech experimentech koncentrace Nth1 konstantní 1μM, koncentrace Bmh1 se pohybovala v rozmezí 0,2-20μM. V obou případech byla K_d stanovena téměř totožně na 10nM s 95% intervalem spolehlivosti < 21nM.

6. Diskuse

V této práci bylo hlavním cílem studium tvorby komplexů v případě tří důležitých regulačních proteinů: signální proteinkinasy ASK1 a modulačního proteinu fosducinu, které jsou zajímavé z medicínského hlediska jakožto potenciální cíle terapeutického zásahu a komplexu enzymu neutrální trehalasy 1 (Nth1) zajímavého z biotechnologického hlediska jakožto možné cíle insekticidních látek. Všechny tyto proteiny mají regulaci založenou protein-proteinových interakcích s proteinem 14-3-3, který je známý svým vysokým počtem interakčních partnerů i účastí na mnoha kontrolních biologických dějích. U ASK1 kinasy byla paralelně studována i vazba na TRX1, která stejně jako 14-3-3 byla *in vivo* popsána jako klíčová pro regulaci enzymové aktivity ASK1.

V práci byly pro studium protein-proteinových interakcí s výhodou využito všech předností metody analytické ultracentrifugace, měření sedimentační rychlosti, pro studium všech výše popsaných systémů. Díky ní bylo možno s nemodifikovanými vzorky zjišťovat velikosti částic v roztoku (s tím i stechiometrií komplexů) a u interagujících systému měřit afinity vzájemných vazeb v závislosti na vazebných partnerech či vnějších podmínkách. Zjištěné vlastnosti tak díky univerzálnímu způsobu detekce (přirozená absorpce ultrafialového záření, měření změny indexu lomu) odrážejí přirozené chování proteinů v roztoku a není zatíženo metodickými chybami jako u ostatních metod, kdy je proteiny třeba extenzivně modifikovat či imobilizovat. Měření velikosti částic v podobě určení jejich sedimentačního koeficientu bylo zpravidla používáno kromě ověření integrity a monodisperzity vzorku k odhadnutí jejich oligomerního stavu. Ačkoliv sedimentační koeficienty obecně nejsou aditivní a nelze obecně předpokládat, že sedimentační koeficient pro dimer by nabýval dvojnásobku koeficientu monomeru, i tak se po přepočtu na relativní molekulovou hmotnost přes Svedbergovu rovnici (Rovnice 1, strana 51) s frikčním koeficientem získaným nelineární regresí jedná o spolehlivé vodítko. Pokud komplex či protein nabývá atypicky asymetrického tvaru (jako například v příkladu fosducinu v této práci) je možné, že vypočítaná hmotnost částice bude jiná než teoretická z důvodu vyššího frikčního koeficientu. Charakteristiky zjištěné měřením sedimentační rychlostí jsou tedy do jisté míry závislé na tvaru studovaných částic. Vyhodnocení dat též selhává u analýzy rychle

interagujících systémů (jako například u ASK1-CD), kdy vlivem dynamické rovnováhy asociace komplexu, se sedimentační koeficient komplexu pohybuje směrem k nižším zdánlivým hodnotám.

6.1 Vazba TRX1 na ASK1

ASK1 má klíčovou roli spouštěče buněčné apoptosy převážně jako odpověď na vnější či vnitřní oxidační stres. Je známo, že v neaktivním stavu ASK1 tvoří proteinové makromolekulární komplexy s velmi vysokou relativní molekulovou hmotností (ASK1 signalosomy) s jinými proteiny. Signalosomy se v přítomnosti oxidačních radikálů rozpadají a ASK1 je v důsledku rozpadu aktivována. Složení tohoto komplexu v současnosti není přesně známo, postupně jsou však jednotlivé komponenty odhalovány a jejich biologický význam vysvětlován. Totální absence strukturních dat, co se týče mezimolekulárních interakcí v tomto systému, však zabraňovala vysvětlení přesného mechanismu inhibice na atomární úrovni. V této práci bylo jako jeden z úkolů získat strukturní náhled do interakcí ASK1 s dvěma jejími fyziologickými inhibitory a identifikovanými komponenty signalosomu, TRX1 a proteinem 14-3-3.

TRX1, oxidoreduktasa přítomná v každé buňce ve vysoké koncentraci, interaguje s N-koncovou částí ASK1 a pravděpodobně tak zabraňuje její oligomerizaci přes N-koncovou CC doménu. Této interakce je však schopný pouze TRX1 v redukováném stavu, tedy když cysteinové postranní řetězce z katalytického motivu $^{31}\text{WCGPC}^{35}$ netvoří intramolekulární disulfidovou vazbu (Saitoh et al., 1998; Fujino et al., 2007; Liu et al., 2000; Liu et al., 2002). Testováním různých konstruktů (viz. strana 45) obsahujících aminokyselinovou sekvenci ASK1 mezi 46. a 322. aminokyselinou ukázalo, že pouze konstrukt o sekvenci 88-302 (ASK1-TBD) dovoľoval přípravu rozpustného a stabilního proteinu, který za redukujících podmínek vázal TRX1 v poměru 1:1 s K_d přibližně 300nM (viz obr. 15A, strana 68). Oxidovaný TRX1 naopak vykázal signifikantně nižší vazebnou afinitu s K_d přibližně 6 μ M (viz obr. 15B, strana 68), což potvrzuje, že oxidace TRX1 vazbu k ASK1-TBD zeslabuje. Nicméně mechanismus, který vede k zeslabení vazby je stále nejasný. Bylo navrženo, že oxidace TRX1 tvoří intramolekulární disulfidové vazby mezi cysteiny 32 a 35 v katalytickém motivu TRX1, a že právě toto je příčinou disociace TRX1 od ASK1 (Saitoh et al., 1998;

Fujino et al., 2007; Liu et al., 2002). Tato hypotéza je též podpořena faktem, že TRX1 CS mutant, kde jsou oba tyto cysteiny vyměněny za serin, nevykazuje významné vazebné schopnosti. Podle výsledků sedimentační analýzy bylo K_d určeno na přibližně 0,5mM (viz obr. 15C, strana 68). Toto pozorování tedy jenom potvrzuje předešlá zjištění, že cysteiny v aktivním místě TRX1 mají pro interakci zásadní důležitost. Sedimentační data též naznačují, že interakce mezi ASK1 a redukovaným TRX1 nezahrnuje mezimolekulární disulfidový můstek. Měření afinity byla totiž prováděna za redukujících podmínek a výsledná data mohla být velmi dobře vysvětlena s použitím modelu zahrnující reverzibilní rovnováhu typu $A + B \rightleftharpoons AB$. Katalytický motiv lidského TRX1 rovněž obsahuje tryptofan na pozici 31, který po oxidaci molekuly a tvorbě intramolekulární disulfidové vazby mezi cysteiny 32 a 35 prochází jistou konformační změnou (Weischel et al., 1996) Krystalografickou analýzou bylo odhaleno, že tato aminokyselina vykazuje za redukčních podmínek jistou míru nestrukturovanosti, ovšem v oxidovaném stavu nebo v TRX1 CS nabývá definované struktury. Tato podobnost TRX1 CS a oxidované formy TRX1 taky může částečně vysvětlit fakt, že TRX1 CS byl popsán i jako kompetitivní inhibitor thioedoxinreduktasy (Oblong et al., 1994). Vzhledem k tomu, že jak oxidovaný TRX1 tak TRX1 CS nevykazují signifikantní vazebné schopnosti k ASK1, je možné, že tato konformační změna přispívá i k destabilizaci vazby mezi těmito dvěma proteiny. Konsistentně s předpokladem, výsledky experimentů v této práci potvrzují, že tryptofan 31 se interakce přímo účastní. Mutant TRX1 W31F, kde tryptofan na 31. pozici byl vyměněn za fenylalanin, má podle sedimentační analýzy K_d přibližně 30 μ M, což znamená signifikantní pokles oproti nemutované variantě ASK1-TBD (viz obr. 15D, strana 68). Časově rozlišené měření dohasínání intenzity i anizotropie fluorescence tryptofanu taktéž v tomto případě ukázalo, že vazba TRX1 W31F na ASK1-TBD zvyšuje τ_{mean} a potlačuje i segmentální dynamiku. V samotném TRX1, tryptofan 31 vykazuje poměrně krátkou τ_{mean} a rychlou emisní depolarizaci, což ukazuje, že je orientovaný směrem k rozpouštědлу a vysoce mobilní. To je též v dobré shodě s pozicí této aminokyseliny na povrchu molekuly. Delší τ_{mean} a pomalejší či více omezenější lokální segmentální pohyby tryptofanu 31 v přítomnosti ASK1-TBD naznačují omezení pohyblivosti katalytického motivu TRX1 po utvoření komplexu (Schauerte et al., 1989) a rovněž nižší přístupnost této části molekuly k polárnímu okolí či zhašecí interakce v těsné blízkosti. Vzhledem k tomu, že je tento aminokyselinový zbytek lokalizovaný na povrchu TRX1, lze interpretovat

pozorované změny jako přímý důsledek účasti tryptofanu 31 na vazbě k ASK1-TBD.

Experimenty se SAXS bylo potvrzeno, že ASK1-TBD je v roztoku monomer a nabývá kompaktního mírně asymetrického tvaru (viz obr. 18, strana 76). Tvar komplexu ASK1-TBD:TRX1 je podobný, ale v jednom směru více protažený. Porovnáním obou rozptylových obálek naznačuje, že TRX1 interaguje s ASK1-TBD přes rozsáhlé interakční rozhraní bez indukce jakékoliv dramatické změny konformace. Strukturní změny pod úroveň rozlišení metody však nelze vyloučit. Strukturní model ASK1-TBD byl získán pomocí *ab initio* modelováním provedeným prof. RNDr. Tomášem Obšilem, Ph.D (Kosek et al., 2014). Vzhledem k tomu, že studovaná oblast ASK1 postrádá jakoukoliv strukturní homologii k známým proteinům, široce rozšířené homologní modelování nemohlo být použito. Nicméně, získaný model, ačkoliv na spekulativní úrovni, je ve shodě s daty ze SAXS, s predikcí sekundární struktury a s výsledky fluorescenčních měření. V předchozích pracích bylo navrženo, že TRX1 svojí vazbou na N-terminální část ASK1 zabraňuje homodimerizaci N-terminální CC domény, což je pro aktivaci ASK1 esenciální proces (Fujino et al., 2007). Strukturní model vycházející z výsledků této práce, je konsistentní s touto teorií. TRX1 a ASK1 mají společné interakční rozhraní v těsné blízkosti elementů N-terminální CC domény v ASK1-TBD a pravděpodobně mírně ovlivňuje její konformaci. Výsledky sedimentační analýzy a měření fluorescence rovněž naznačují, že aminokyselina cystein 250 v sekvenci ASK1, která již dříve byla popsána jako zásadní pro interakci TRX1 a ASK1, je lokalizována v těsné blízkosti společného interakčního rozhraní.

6.2 Vazba proteinu 14-3-3 na ASK1

V případě kinasové domény ASK1 byla studována interakce s proteinem 14-3-3, specificky isoformou ζ , u níž byla již dříve ukázána oproti ostatním isoformám vyšší míra vazby k ASK1 (Subramanian et al., 2004). Protein 14-3-3 je rozšířený regulátor účastnící se kontroly mnoha buněčných dějů jako je apoptosa, buněčný cyklus, diferenciace a proliferace, vazba je zpravidla závislá na fosforylaci jeho vazebného místa na serinu, čímž zvyšuje počet možných úrovní regulace konkrétního děje. Byly obecně popsány tři způsoby jako proteiny 14-3-3 vykonávají svojí funkci: mění konformační strukturu svého vazebného partnera, svojí vazbou zablokuje jiné důležité

místo na povrchu interakčního partnera nebo slouží jako adaptorový protein fixující jiné interagující elementy vůči sobě ve vzájemné blízkosti. Pochopení, jak 14-3-3 v systému aktivace ASK1 za oxidačního stresu funguje na strukturní úrovni, je pravděpodobně jeden z klíčových prvků k vysvětlení funkce celého ASK1 signalosomu. Tato interakce je závislá na fosforylaci serinu na 967. pozici, jež je lokalizován ve struktuře této signální kinasy na flexibilním úseku za kinasovou doménou, a poskytuje tak zajímavou analogii k dalším systémům závislým na vazbě 14-3-3 jako například interakce s proteinem BAD, nebo kinasou Raf-1 (Truong et al., 2002), ale třeba i s proteinem RGS3 (Rezabkova et al., 2010) či serotonin-N-acetyltransferasou (Obsil et al., 2001) a dalších (Bustos 2012, Colins 2008), kdy vazebné místo pro protein 14-3-3 je obecně umístěno na flexibilním úseku v blízkosti strukturního motivu, který konkrétním způsobem ovlivňuje. Jedná se o typický rys interakcí proteinu 14-3-3, avšak odhalení strukturního mechanismu inhibice, který je do současnosti stále pouze diskutován, je prvním krokem k odhalení celého procesu aktivace tohoto farmaceuticky zajímavého proteinu ASK1.

Pro odhalení podstaty inhibice byl připraven konstrukt ASK1, který v sobě obsahoval kinasovou doménu a vazebné místo pro protein 14-3-3, které bylo modifikováno pro fosforylaci pomocí komerční PKA (ASK1-CD). Struktura kinasové domény již byla rozřešena v komplexu s univerzálním inhibitorem kinas staurosporinem (Buncoczi et al., 2007) a poskytla vodítko při návrhu konstruktů. Po vyvinutí purifikačního protokolu pro tento konstrukt, úspěšné fosforylaci vazebného motivu pomocí PKA však bylo sedimentační analýzou zjištěno, že 14-3-3 ζ vykazuje pouze velmi slabou afinitu pro ASK1-CD. V souladu se známými autoinhibičními účinky C-terminálního flexibilního úseku musel být pro zvýšení vazebné afinity použit mutant 14-3-3 $\zeta\Delta C$, s jehož použitím byla stanovena K_d komplexu na přibližně 4 μ M za použití vazebného modelu 2:2 s předpokladem dynamické rovnováhy a nedisociujících dimerů ASK1-CD i 14-3-3 $\zeta\Delta C$ (viz obr. 22, stana 84). Fakt, že oba proteiny se vyskytují téměř ze sta procent ve formě dimerů bylo též potvrzeno sedimentační analýzou. Podle těchto výsledků se tedy jedná o slabší vazebnou interakci pravděpodobně transientního charakteru, jak dokládá výrazná závislost sedimentačního koeficientu komplexu na koncentraci 14-3-3 $\zeta\Delta C$ při konstantní koncentraci ASK1-CD. To také dokládá, že se jedná o vysoce dynamickou interakci, kdy doba života komplexu spadá do časové škály experimentu. Vzhledem k charakteru vazby byla pro získání strukturního náhledu

použita metodika SAXS. Jejím prostřednictvím bylo potvrzeno, že samotné proteiny ASK1-CD i 14-3-3 ζ Δ C tvoří v roztoku dimery a že komplex ASK1-CD:14-3-3 ζ Δ C má stechiometrii vazby 2:2. Rozptylové obálky odrážející tvar studovaných molekul jsou v případě samotných proteinů ve shodě s jejich známými krystalovými strukturami (viz obr. 23, strana 86). 14-3-3 ζ Δ C vykazuje tvar tvaru U se zřetelnou vaznou kavitou uprostřed. ASK1-CD má naopak kompaktní střední část velikostně i tvarově odpovídající krystalové struktuře kinasové domény ASK1. Po obou stranách má však kulovité oblasti, které se strukturou nesouhlasí. Vzhledem k tomu, že se nacházejí v blízkosti C-konce strukturního modelu, je pravděpodobné, že se jedná o úsek s vazebným místem pro 14-3-3, který v něm není zahrnut. Tvar komplexu nabývá kompaktního a vysoce asymetrického tvaru (viz obr. 23, strana 86). Na otázku složení a struktury komplexu však neodpovídá jednoznačně, neboť výsledná rozptylová obálka může být interpretována dvěma způsoby. Jedna možnost předpokládá interakci typu dimer:dimer s tím, že vazby se vždy účastní pouze jeden monomer s každého proteinu. Dimery v tomto případě nedisociují a interakční rozhraní je relativně malé (viz obr. 24, strana 87), což by odpovídalo sedimentačním analýzám a zjištění slabší transienční interakce mezi ASK1-CD a 14-3-3 ζ Δ C. Vzhledem k asymetrickému tvaru komplexu taktéž pravděpodobně nelze předpokládat, že by se ASK1-CD vázala na 14-3-3 ζ Δ C na straně s vaznou kavitou. Druhá možnost bere v potaz možnou disociaci dimeru ASK1-CD. Pro tento komplex, ačkoliv pomocí provedených sedimentačních analýz nebylo možno detekovat tvorbu monomerů i při vysokých zředěních, byla již dříve určena K_d na $(0,22 \pm 0,2)\mu\text{M}$ pomocí sedimentační rovnováhy při koncentraci vzorku $10\mu\text{M}$ (Bunkoczi et al., 2007). Ačkoliv přesnost tohoto výsledku je metodicky poměrně spekulativní, je jisté i z pozorování v této práci, že dimer ASK1-CD je velice stabilní částice. Teoreticky je však možné, že ve vzorku je přítomná malá frakce ASK1-CD jako monomer (pomocí sedimentační rychlosti problematicky pozorovatelná, nebo vzniká až po kontaktu s interakčním partnerem), který se na 14-3-3 ζ Δ C váže separátně a druhý monomer se okamžitě váže na jiné místo na povrchu 14-3-3 ζ Δ C (viz obr. 24, strana 87). V tomto případě pravděpodobně nelze předpokládat ekvivalentnost obou vazebných míst a matematický model, který by takovýto mechanismus interakce dokázal popsat v souladu s daty ze sedimentační analýzy v současnosti není dostupný nebo vyžaduje informace o sedimentaci a interakcích samotných monomerů. Rovněž o pozici C-terminálního segmentu ASK1 lze podle dat ze SAXS pouze spekulovat, protože je

možné, že se v roztoku chová značně flexibilně a části rozptylové obálky komplexu ASK1-CD:14-3-3 ζ Δ C mohou ve skutečnosti být průměrem odlišných konformací tohoto segmentu. K rozluštění struktury tohoto komplexu tak budou muset přispět další biofyzikální experimenty, které pomohou odhalit strukturu komplexu. Je též pravděpodobné, že pro stabilitu komplexu pozorovaného *in vivo* přispívají i jiné regiony ASK1 a mechanismus funkce 14-3-3 je v tomto případě daleko složitější, než bylo doposud předpokládáno. Výsledky týkající se ASK1-CD tedy prozatím nebyly publikovány.

6.3 Vazba proteinu 14-3-3 na fosducin

Protein 14-3-3 se podílí na regulaci dalšího proteinu, který je významným regulačním prvkem tentokrát v biochemii zraku, fosducinu. Fosducin též zapadá do konceptu interakčních partnerů 14-3-3, které mají vazebné místo na flexibilních segmentech. Teoretické predikce i biofyzikální experimenty jasně ukazují, že N-terminální část fosducinu Pdc-ND vykazuje v porovnání s C-koncovou Pdc-CD prvky vnitřní nestrukturovanosti a že zaujímá velmi objemnou konformaci. Rovněž bylo zjištěno z fluorescenčních experimentů, že fosducin se na protein 14-3-3 ζ Δ C (používaný místo přirozeného 14-3-3 ζ ze stejného důvodu jako u ASK1-CD, vyšší síly vazebné interakce) váže i mimo charakteristickou vazebnou kavitu. Lze předpokládat, že fosforylovaný N-terminální segment je lokalizován právě v kavitě, zatímco kompaktní strukturovaný C-terminální je vázán mimo tuto interakční oblast (Kacirova et al. 2015). Analýza separovaných částí fosducinu provedená v rámci této práce odhalila, že Pdc-CD nevykazuje žádnou signifikantní vazbu na 14-3-3 ζ Δ C a Pdc-ND, který naopak vykazuje vazbu silnější než v případě fosducinu celého, je tak za stabilitu komplexu fosforylovaného Pdc:14-3-3 ζ Δ C zodpovědný (viz. obr. 26, strana 90). Naznačuje to též, že pozorované interakce mezi 14-3-3 ζ Δ C a Pdc-CD podporuje efekt lokální koncentrace po vazbě N-terminálního segmentu fosducinu do vazebné kavity 14-3-3 ζ Δ C. Komplex Pdc:14-3-3 ζ Δ C se tak podobá mnoha jiným komplexům proteinu 14-3-3, kde významná interakce pro asociaci není jen vazba fosforylovaného vazebného motivu, ale rovněž i interakce se vzdálenějšími oblastmi od něj ačkoliv sami o sobě nejsou pro vazbu dostatečné. Bylo též ukázáno, že Pdc-ND obsahuje převážnou část interakčního

rozhraní s $G_i\beta\gamma$, zatím co Pdc-CD se zdá odpovědný spíše za blokaci interakce $G_i\beta\gamma$ v komplexu s celulární membránou (Gaudet et al., 1996; Gaudet et al., 1999). Interakce fosducinu se 14-3-3 ζ tak může stéricky blokovat právě oblast interagující se $G_i\beta\gamma$ a modifikovat jeho strukturu, tak aby docházelo k pomalejší defosforylaci po světelném signálu (Thulin et al., 2001).

6.4 Závislost tvorby komplexu *Nth1:Bmh1* na přítomnosti vápníku

Analog proteinu 14-3-3 v *Saccharomyces cerevesiae*, Bmh1, byl též popsán jako aktivační element proteinu neutrální trehalasa 1 (Nth1). V tomto případě je míra aktivace dokonce jasně závislá i na přítomnosti vápenatých kationů, které se váží na "EF-hand like" motiv na N-terminální části proteinu. Již dříve bylo zjištěno, že Bmh1 indukuje v tomto motivu i katalytické doméně jisté signifikantní konformační změny, vedoucí k aktivaci, pro plnou aktivaci proteinu však samotné Bmh1 nestačí a vazba vápníku je pro míru výsledné enzymové aktivity naprosto zásadní (Macakova et al., 2013). Bylo navrženo, že Ca^{2+} vazebný motiv nabývá v závislosti na přítomnosti Bmh1 a ionů Ca^{2+} rozdílných konformací, vysvětlujících rozdílné aktivity Nth1, což bylo potvrzeno i malouhlovým rozptylem světla. Z něj též vyplynulo, že "EF-hand like" motiv pravděpodobně tvoří separátní doménu interagující s dimerem Bmh1 jak přes vnitřní vaznou kavitu Bmh1 tak s vnějším povrchem (Kopecká et al., 2014). Tato doména by tak mohla v odlišných konformačních stavech vazbu Nth1 k Bmh1 modulovat s odlišnými účinky, zejména v závislosti na vazbě vápenatých kationů. Pro charakterizaci tohoto efektu byla provedena sedimentační analýza, která však neodhalila žádnou signifikantní změnu vazebné afinity Bmh1 k fosforylované Nth1 v přítomnosti a nepřítomnosti vápenatých kationů. Je však možné, že ke změnám dochází v oblasti pod rozlišením této metody, ale vzhledem k tomu, že zdánlivá disociační konstanta byla určena menší než 21nM, je otázka, zdali by taková změna měla vůbec biologický význam. Nicméně důležitost "EF-hand like" motivu byla prokázána (Kopecká et al., 2014), mechanismus potenciace enzymové aktivity v přítomnosti vápenatých iontů však nelze vysvětlit zvýšením nebo jinou modulací vazebné afinity Bmh1 k Nth1.

7. Závěr

Hlavním cílem této práce bylo studium protein-proteinových interakcí v regulaci vybraných proteinů ASK1, fosducinu a Nth1. Důraz byl kladen zejména na přípravu, biofyzikální popis a objasnění úlohy protein-proteinových interakcí u studovaných komplexů. Pomocí metod biochemických (rekombinantní příprava proteinů a jejich mutantů) i biofyzikálních (časově rozlišené dohasínání intenzity a anizotropie fluorescence, malouhlový rozptyl rentgenového záření, analytická ultracentrifugace) bylo dosaženo následujících výsledků:

A) Komplexy ASK1 proteinkinasy s TRX1 a 14-3-3:

- ASK1-TBD (88-302) je v roztoku rigidní monomerní doména.
- ASK1-TBD tvoří s redukovaným TRX1 ekvimolární komplex, přičemž cysteiny z katalytického motivu TRX1 jsou pro vazbu esenciální.
- Fluorescenční měření odhalila, že tryptofan 31 v TRX1 se přímo účastní vazby na ASK1 a je významným faktorem pro stabilitu komplexu. Rovněž cystein 250 v sekvenci ASK1-TBD má důležitý stabilizační ačkoliv zatím nevysvětlený vliv.
- Interakce mezi ASK1-TBD a TRX1 není závislá na tvorbě mezimolekulárních disulfidových můstků.
- Výsledky ze SAXS ukazují, že TRX1 interaguje s ASK1-TBD přes velké interakční rozhraní aniž by indukoval zásadní konformační změny měnící tvar molekuly ASK1-TBD.
- Na základě dat z fluorescenčních a SAXS měření byl navržen strukturní model komplexu, který ukazuje, že TRX1 se váže na ASK-TBD v oblasti obsahující cystein 250.
- Izolovaná ASK1-CD tvoří s proteinem 14-3-3 komplex se stechiometrií 2:2, kde dimer 14-3-3 váže dimer ASK1-CD.
- Interakce mezi ASK1-CD a 14-3-3 má slabý, transientní charakter s dobou života komplexu v časové škále sedimentačního experimentu.
- Výsledky ze SAXS potvrzují stechiometrii komplexu ASK1-CD:14-3-3 ζ Δ C 2:2,

avšak díky výrazně asymetrickému tvaru neposkytují jednoznačné řešení uspořádání jednotlivých podjednotek. K rozřešení strukturních prvků budou třeba další experimenty.

B) Studium strukturní funkce vazby proteinu 14-3-3 na fosducin

- Separované domény fosducinu Pdc-ND i Pdc-CD tvoří v roztoku dobře definované monomery.
- Pdc-ND vykazuje v porovnání s celým fosducinem mírně větší vazebnou afinitu, naopak Pdc-CD nevykazuje žádné známky interakce s 14-3-3 $\zeta\Delta$ C. N-koncový segment je tak zodpovědný za stabilitu tohoto komplexu a pravděpodobně i blokaci vazebného místa pro G $\beta\gamma$ transducinu.

C) Studium vlivu vápenatých kationů na vazbu neutrální trehalasy 1 k Bmh1

- Míra vazebné afinity vazby Nth1 k Bmh1 se v závislosti na přítomnosti vápenatých kationů nemění, je však možné, že dochází k malým změnám pod rozlišení použité metody.
- Zvýšení enzymové aktivity Nth1 v přítomnosti vápníku a Bmh1 nelze vysvětlit změnami v síle interakce mezi těmito proteiny.

Výsledky byly publikovány v rámci třech odborných článků v magazínu Journal of Biological Chemistry.

Seznam citované literatury:

- Agarwal-Mawal A., Qureshi H. Y., Cafferty P. W., Yuan Z., Han D., Lin R., Paudel H. K.: *J. Biol. Chem.*, 278, 12722-12728 (2003)
- Aitken A., Howell S., Jones D., Madrazo J., Patel Y.: *J. Biol. Chem.*, 270, 5706-5709 (1995)
- Amaral F. C., Van Dijck P., Nicoli J. R., Thevelein J. M.: *Arch. Microbiol.*, 167, 202-208 (1997)
- App H., Holzer H.: *J. Biol. Chem.*, 264, 17583-17588 (1989)
- Bauer P. H., Muller S., Puzicha M., Pippig S., Obermaier B., Helmreich E. J., Lohse M. J.: *Nature*, 358, 73-76 (1992)
- Becker A., Schloeder P., Steele J. E., Wegener G.: *Experientia*, 52, 433-439 (1996)
- Benzing T., Yaffe M. B., Arnould T., Sellin L., Schermer B., Schilling B., Schreiber R., Kunzelmann K., Leparac G. G., Kim E., Walz G.: *J. Biol. Chem.*, 275, 28167-28172 (2000)
- Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E.: *Nuc. Acids Res.*, 28, 235-242 (2000)
- Bogan A. A., Thorn K. S.: *J. Mol. Biol.*, 280, 1-9 (1998)
- Bordner A. J., Abagyan R.: *Proteins*, 60, 353-366 (2005)
- Brandt D. R., Ross E. M.: *J. Biol. Chem.*, 260, 266-272 (1985)
- Bryan R.K.: *Eur. Biophys. J.*, 18, 165-174 (1990)
- Bunkoczi G., Salah E., Filippakopoulos P., Fedorov O., Muller S., Sobott F., Parker S. A., Zhang H., Min W., Turk B. E., Knapp, S.: *Structure*, 15, 1215-1226 (2007)
- Bustos D. M.: *Mol. Biosyst.*, 8, 178-184 (2012)
- Cabib E., Leloir, L.: *J. Biol. Chem.*, 231, 259-275 (1958)
- Collins M. O., Yu L., Campuzano I., Grant S. G., Choudhary, J. S.: *Mol. Cell Proteomics*, 7, 1331-1348 (2008)
- Conklin D. S., Galaktionov K., Beach D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92, 7892-7896 (1995)

- Conte L. L., Chothia C., Janin J.: *J. Mol. Biol.*, 285, 2177–2198 (1999)
- Correia J. J.: *Meth. Enzymol.*, 321, 81–100 (2000)
- Crews C., Alessandrini A., Erikson R.: *Science*, 258, 478–480 (1992)
- Dam J., Schuck P.: *Biophys. J.*, 89, 651–666 (2000)
- Dam J., Velikovsky C.A, Mariuzza R.A., Urbanke C., Schuck P.: *Biophys. J.*, 89, 619–634 (2005)
- Danner S., Lohse M. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93, 10145–10150 (1996)
- Elbein A. D., Pan Y. T., Pastuszak I., Carroll D.: *Glycobiology*, 13, 17R–27R (2003)
- Errede B., Cade R. M., Yashar B. M., Kamada Y., Levin D. E., Irie K., Matsumoto K.: *Mol. Reprod. Dev.*, 42, 477–485 (1995)
- Evanko D. S., Thiyagarajan M. M., Siderovski D. P., Wedegaertner P. B.: *J. Biol. Chem.*, 276, 23945–23953 (2001)
- Ferl R. J., Manak M. S., Reyes M. F.: *Genome Biol.*, 3, REVIEWS3010 (2002)
- Fernandez A., Scheraga H. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 113–118 (2003)
- Ford C. E., Skiba N. P., Bae H., Daaka Y., Reuveny E., Shekter L. R. et al.: *Science*, 280, 1271–1274 (1998)
- Franco A., Soto T., Vicente-Soler J., Paredes V., Madrid M., Gacto M., Cansado J.: *Biochem. J.*: 376, 209–217 (2003)
- Fujii K., Goldman E. H., Park H. R., Zhang L., Chen J., Fu. H.: *Oncogene*, 23, 5099–5104 (2004)
- Fujino G., Noguchi T., Matsuzawa A., Yamauchi S., Saitoh M., Takeda K., Ichijo H.: *Mol. Cell. Biol.*, 27, 8152–8163 (2007)
- Ganguly S., Gastel J. A., Welle, 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.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98, 8083–8088 (2001)
- Gardino A K., Smerdon S. J., Yaffe M. B.: *Semin. Cancer Biol.*, 16, 173–182 (2006)
- Gaudet R., Bohm A., Sigler P. B.: *Cell*, 87, 577–588 (1996)
- Gaudet R., Savage J. R., McLaughlin J. N., Willardson B. M., Sigler P. B.: *Mol. Cell*, 3, 649–660 (1999)
- Ghirlando R., Balbo A., Piszczek G., Brown P. H., Lewis M. S., Brautigam C. A., Schuck P., Zhao H.: *Anal. Biochem.*, 440, 81–95 (2013)
- Glatter O.: *J. Appl. Crystallogr.*, 10, 415–421 (1977)

- Goldman E. H., Chen L., Fu. H.: *J. Biol. Chem.*, 279, 10442–10449 (2004)
- Good M. C., Zalatan J. G., Lim W.A.: *Science*, 332, 680-686 (2012)
- Guinier A.: *Ann. Phys.*, 12, 161–237 (1939) (převzato z Blanchet C. E., Svergun D. I.: *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 64, 37-54, (2013)
- Gustin M. C., Albertyn J., Alexander M., Davenport K.: *Mol. Biol. Rev.*, 62, 1264–1300 (1998)
- Hargrave P. A., McDowell J. H.: *FASEB J.*, 6, 2323-2331 (1992)
- Hashemy S. I., Holmgren, A.: *J. Biol. Chem.*, 283, 21890–21898 (2008)
- Holmgren A., Söderberg B. O., Eklund H., Brändén C. I.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 2305–2309 (1975)
- Horton N., Lewis M.: *Protein Sci.*, 1, 169–181 (1992)
- Hwang I. S, Jung Y.S., Kim E.: *FEBS Lett.*, 529, 183–187 (2002)
- Ichijo H., Nishida E., Irie K., Dijke P., Saitoh M., Moriguchi T., Takagi M., Matsumoto K., Miyazono K., Gotoh Y.: *Science*, 275, 90-94 (1997)
- Ichimura T., Isobe T., Okuyama T., Takahashi N., Araki K., Kuwano R., Takahashi Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85, 7084-7088 (1988)
- Jacques D.A., Guss J. M., Svergun D. I., Trewhella J.: *Acta Crystallogr. D*, 68, 620–626 (2012)
- Janin J., Chothia C.: *J. Biol. Chem.*, 265, 16027–16030 (1990)
- Janin J.: *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 64, 145–166 (1995)
- Jones D. T.: *J. Mol. Biol.*, 292, 195-202 (1999)
- Jones S., Thornton J. M.: *J. Mol. Biol.*, 272, 133–143 (1997)
- Jones S., Thornton J. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93, 13–20 (1996)
- Kacirova M., Kosek D., Kadek A., Man P., Vecer J., Herman P., Obsilova V., Obsil T.: *J. Biol. Chem.* (2015) - přijato k tisku
- Kawarazaki Y., Ichijo H., Naguro I.: *Expert Opin. Ther. Targets*, 18, 651-664 (2014)
- Kim A. H., Khursigara G., Sun X., Franke T. F., Chao M. V.: *Mol. Cell. Biol.*, 21, 893–901 (2001)

- Kopecka M., Kosek D., Kukacka Z., Rezaczkova L., Man P., Novak P., Obsil T., Obsilova V.: *J. Biol. Chem.*, 289, 13948-61 (2014)
- Kopp M., Muller H., Holzer H.: *J. Biol. Chem.*, 268, 4766-4774 (1993)
- Kosek D., Kylarova S., Psenakova K., Rezaczkova L., Herman P., Vecer J., Obsilova V., Obsil T.: *J. Biol. Chem.*, 289, 24463-24474 (2014)
- Lackowitz J. R.: *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer (1992)
- Lamm, O.: *Ark. Mat. Astr. Fys.*, 21B, 21-24 (1929)
- Laue T. M., Shah B. D., Ridgeway T. M., Pelletier S. L.: *The Royal Society of Chemistry*, pp. 90-125 (1992)
- Lebowitz J., Lewis M. S., Schuck P.: *Protein Sci.*, 11, 2067-2079 (2002)
- Lee R. H., Brown B. M., Lolley R. N.: *Biochemistry*, 23, 1972-1977 (1984)
- Lee R. H., Fowler A., McGinnis J. F., Lolley, R. N., Craft C. M.: *J. Biol. Chem.*, 265, 15867-15873 (1990)
- Lee R. H., Lieberman B. S., Lolley R. N.: *Biochemistry*, 26, 3983-3990 (1987)
- Lewis T. S., Shapiro P. S., Ahn N. G.: *Adv. Cancer Res.*, 74, 149-139 (1998)
- Liu D., Bienkowska J., Petosa C., Collier R. J., Fu H., Liddington R.: *Nature*, 376, 191-194 (1995)
- Liu Y., Min W.: *Circ. Res.* 90, 1259-1266 (2002)
- Liu, H., Nishitoh H., Ichijo H., Kyriakis J. M.: *Mol. Cell. Biol.*, 20, 2198-2208 (2000)
- Liu, Q., Wilkins B. J., Lee Y. J., Ichijo H., J. D. Molkentin.: *Mol. Cell. Biol.*, 26, 263785-3797. (2006)
- Loew A., Ho Y. K., Blundell T., Bax B.: *Structure*, 6, 1007-1019 (1998)
- Lolley R. N., Lee R. H.: *FASEB J.*, 4, 3001-3008 (1990)
- Macakova E., Kopecka M., Kukacka Z., Veisova D., Novak P., Man P., Obsil T., Obsilova V.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1830, 4491-4499 (2013)
- McCudden C. R., Hains M. D., Kimple R. J., Siderovski D. P., Willard F. S.: *Cell Mol. Life Sci.*, 62, 551-577 (2005)
- Moore B. W, McGregor D.: *J. Biol. Chem.*, 240, 1647-1653 (1965)
- Mylonas E., Svergun D. I.: *J. Appl. Crystallogr.*, 40, S245-492007 (2007)

- Nadeau P. J., Charette S. J., Landry J.: *Mol. Biol. Cell*, 20, 3628–3637 (2009)
- Nadeau P. J., Charette S. J., Toledano M. B., Landry J.: *Mol. Biol. Cell*, 18, 3903–3913 (2007)
- Nakano K., Chen J., Tarr G. E., Yoshida T., Flynn J. M., Bitensky M. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98, 4693-4698 (2001)
- Nishitoh H., Matsuzawa A., Tobiume K., Saegusa K., Takeda K., Inoue K., Hori S., Kakizuka A., Ichijo, H.: *Genes Dev.*, 16, 1345-1355 (2002)
- Noguchi T., Taked, K., Matsuzawa A., Saegusa K., Nakano H., Gohda J., Inoue J., and Ichijo H.: *J. Biol. Chem.*, 280, 37033–37040 (2005)
- Noubhani A., Bunoust O., Rigolet M., Thevelein, J. M.: *Eur. J. Biochem.*, 267, 4566-4576 (2000)
- Nwaka S., Mechler B., Destruelle M., Holzer H.: *FEBS Lett.*, 360, 286-290 (1995)
- Oblong J. E., Berggren M., Gasdaska P. Y., Powis, G.: *J. Biol. Chem.*, 269, 11714–11720 (1994)
- Obsil T., Ghirlando R., Klein D. C., Ganguly S., Dyda F.: *Cell* 105, 257-267 (2001)
- Obsilova V., Herman P., Vecer J., Sulc M., Teisinger J., Obsil T.: *J. Biol. Chem.*, 279, 4531-4540 (2004)
- Ortiz C. H., Maia J. C., Tenan M. N., Braz-Padrao G. R., Mattoon J. R., Panek A. D.: *J. Bacteriol.*, 153, 644–651 (1983)
- Panni S., Landgraf C., Volkmer-Engert R., Cesareni G., Castagnoli, L.: *FEMS Yeast Res.*, 8, 53–63 (2008)
- Philo J. S.: *Anal. Biochem.*, 279, 151-163 (2000)
- Pearson G., Robinson F., Beers-Gibson T., Xu B. E., Karandikar M., Berman K., Cobb M. H.: *Endocr Rev.*, 22, 153-183 (2001)
- Porod G.: *General theory In Small-Angle X-Ray Scattering*, pp. 17–51, Academic, NY (1982)
- Porter G. W., Khuri F. R., Fu, H.: *Semin. Cancer Biol.*, 16, 193-202 (2006)
- Powis G., Montfort W. R.: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30, 421–455 (2001)
- Qin J., Clore G. M., Gronenborn A. M.: *Structure*, 2, 503-522 (1994)
- Rezabkova L., Boura E., Herman P., Vecer J., Bourova L., Sulc M., Svoboda P., Obsilova V., Obsil T.: *J. Struct. Biol.*, 170, 451-461 (2010)

- Rezakbova L., Kacirova M., Sulc M., Herman P., Vecer J., Stepanek M., Obsilova V., Obsil T.: *Biophys. J.*, 103, 1960-1969 (2012)
- Rittinger K., Budman J., Xu J., Volinia S., Cantley L. C., Smerdon S. J., Gamblin S. J., Yaffe, M. B.: *Mol. Cell*, 4, 153-166 (1999)
- Roessle M. W., Klaering R., Ristau U., Robrahn B., Jahn D., Gehrman T., Konarev P., Round A., Fiedler S., Hermes C., Svergun D.: *J. Appl. Crystallogr.*, 40, S190–S194 (2007)
- Rosenquist M., Alsterfjord M., Larsson C., Sommarin M.: *Plant Physiol.*, 127, 142-149 (2001)
- Ruf J., Wacker H., James P., Maffia M., Seiler P., Galand G., Kiekebusch A., Semenza G., Mantei N.: *J. Biol. Chem.*, 265, 15034-15040 (1990)
- Saitoh M., Nishitoh H., Fujii M., Takeda K., Tobiume K., Sawada Y., Kawabata M., Miyazono K., Ichijo H.: *EMBO J.*, 17, 2596-2606 (1998)
- Seeger R., Seeger D., Lozeman F.J., Ahn N.G., Graves L. M., Campbell J. S., Ericsson L., Harrylock M., Jensen A. M., Krebs E. G.: *J. Biol. Chem.*, 267, 25628–25631 (1992)
- Sheinerman F. B., Norel R., Honig B.: *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10, 153–159 (2000)
- Schachman H. K.: Royal Society of Chemistry, pp. 3-15, (1992)
- Schauerte J. A., Gafni, A.: *Biochemistry* 28, 3948–3954 (1989)
- Schepers W., Van Zeebroeck G., Pinkse M., Verhaert P., Thevelein J. M.: *J. Biol. Chem.*, 287, 44130–44142 (2012)
- Schuck P., Braswell, E. H.: *Curr. Prot. Immunol.*, pp. 18.18.11–18.18.22. (2000)
- Schuck P.: *Biophys. J.*, 75, 1503-1512 (1998)
- Schuck P.: *Biophys. J.*, 78, 1606-1619 (2000)a
- Silhan J., Obsilova V., Vecer J., Herman P., Sulc M., Teisinger J., Obsil T.: *J. Biol. Chem.*, 279, 49113-49119 (2004)
- Silverstein T.P.: *J. Chem. Educ.*, 75, 116-120 (1998)
- Song Y., DiMaio F., Wang R. Y., Kim D., Miles C., Brunette T., Thompson J., Baker, D.: *Structure*, 21, 1735–1742 (2013)
- Svedberg T., Pedersen K. O.: *The ultracentrifuge*, Oxford University Press (1940)
- Svergun D. I.: *J. Appl. Crystallogr.*, 25, 495–503 (1992)

- Svergun D.I.: *Biophys. J.*, 76, 2879–2886 (1999)
- Subramanian R. R., Zhang H., Wang H., Ichijo H., Miyashita T., Fu H.: *Exp. Cell Res.*, 294, 581-591 (2004)
- Takeda K., Matsuzawa A., Nishitoh H., Tobiume K., Kishida S., Ninomiya-Tsuji J., Matsumoto, K., and Ichijo, H.: *EMBO Rep.*, 5, 161-166 (2004)
- Tan S.: *Prot. Exp. Pur.*, 21, 224–234 (2001)
- Teller D. C., Swanson E., DeHaen C.: *Methods Enzymol.*, 61, 103–124 (1979)
- Thornton J. M.: *Protein Sci.*, 10, 3–11 (2001)
- 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.: *J. Biol. Chem.*, 276, 23805-23815 (2001)
- Tobiume K., Saitoh M., Ichijo, H.: *J. Cell Physiol.*, 191, 95–104 (2002)
- Truong A. B., Masters S. C., Yang H., Fu H.: *Proteins*, 49, 321-325 (2002)
- Uno I., Matsumoto K., Adachi K., Ishikawa T.: *J. Biol. Chem.*, 258, 10867–10872 (1983)
- van Der Heide L. P., Hoekman M. F., Smidt M. P.: *Biochem. J.*, 380, 297-309 (2004)
- van Der Hoeven P. C., Van Der Wal J. C., Ruurs P., Van Blitterswijk W. J.: *Biochem. J.*, 347, 781-785 (2000)
- van Hemert M. J., Steensma H. Y., van Heusden G. P.: *Bioessays*, 23, 936-946 (2001)
- van Heusden G P., Steensma, H. Y.: *Yeast*, 23, 159-171 (2006)
- van Holde K. E., Johnson W. C., Ho P. S.: *Principles of physical biochemistry*, Prentice Hall-Upper Saddle River, NJ (2000)
- van Holde K. E., Weischet W. O.: *Biopolymers*, 17, 1387-1403 (1978)
- Veisova D., Macakova E., Rezabkova L., Sulc M., Vacha P., Sychrova H., Obsil T., Obsilova V.: *Biochem. J.*, 443, 663–670 (2012)
- Veisova D., Rezabkova L., Stepanek M., Novotna P., Herman P., Vecer J., Obsil T., Obsilova V.: *Biochemistry*, 49, 3853-3861 (2010)
- Volkov V.V., Svergun D. I.: *J. Appl. Crystallogr.* 36, 860–864 (2003)

- Wilkins, J. F., Bitensky, M. W., Willardson, B. M.: *J. Biol. Chem.*, 271, 19232-19237 (1996)
- Willardson B. M., Wilkins J. F., Yoshida T., Bitensky M. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93, 1475-1479 (1996)
- Xiao B., Smerdon S. J., Jones D. H., Dodson G. G., Soneji Y., Aitken A., et al.: *Nature*, 376, 188–191 (1995)
- Yaffe M. B.: *FEBS Lett.*, 513, 53-57 (2002)
- Yang X., Lee W. H., Sobott F., Papagrigoriou E., Robinson C. V., Grossmann J. G., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103, 17237–17242 (2006)
- Yonemaya Y., Lever, J. E.: *J. Cell. Physiol.*, 131, 330-341 (1987)
- Young L., Jernigan R. L., Covell D. G.: *Protein Sci.*, 3, 717–729 (1994)
- Zhang L., Chen J., Fu, H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96, 8511–8515 (1999)
- Zhang R., Al-Lamki R., Bai L., Streb J. W., Miano J. M., Bradley J., Min W.: *Circ. Res.*, 94, 1483–1491 (2004)
- Weichsel, A., Gasdaska, J. R., Powis, G., Montfort, W. R.: *Structure*, 4, 735-751 (1996)
- Zhang R., He W., Liu W., Lu M., Hsieh J. T., Min W.: *J. Clin. Invest.*, 111, 1933–1943 (2003)
- Zhang R., Zhang H, Lin Y., Li J., Pober J. S., Min W.: *J. Biol. Chem.*: 282, 14788-14796 (2007)

Přílohy:

Publikace 1

Kacirova M., Kosek D., Kadek A., Man P., Vecer J., Herman P., Obsilova V., Obsil T.:
Structural Characterization of Phosducin and its Complex with the 14-3-3 Protein, J.
Biol. Chem. (2015) - J. Biol. Chem., přijato k tisku J.Biol.Chem.

Podíl autora na publikaci:

V rámci této publikace jsem všechna měření sedimentačních rychlostí společně s následným zpracováním, analýzou a interpretací sedimentačních dat.

Structural Characterization of Phosducin and its Complex with the 14-3-3 Protein

Miroslava Kacirova^{1,2}, Dalibor Kosek^{1,2}, Alan Kadek^{3,4}, Petr Man^{3,4}, Jaroslav Vecer⁵, Petr Herman⁵, Veronika Obsilova^{2,*}, and Tomas Obsil^{1,2,*}

¹ Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, 12843 Prague, Czech Republic,

² Institute of Physiology, Czech Academy of Sciences, 14220 Prague, Czech Republic,

³ Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, 14220 Prague, Czech Republic,

⁴ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, 12843 Prague, Czech Republic,

⁵ Institute of Physics, Faculty of Mathematics and Physics, Charles University in Prague, 12116 Prague, Czech Republic

Running Title: *Structural Analysis of Phosducin and its Complex with 14-3-3*

* To whom correspondence should be addressed. Tel.: +420 221951303; Fax: +420 224919752; E-mail: obsil@natur.cuni.cz (T. Obsil); Tel.: +420 241062191; Fax: +420 244472269; E-mail: veronika.obsilova@fgu.cas.cz (V. Obsilova).

Keywords: Phosducin, 14-3-3 protein, small-angle X-ray scattering (SAXS), fluorescence, hydrogen-deuterium exchange coupled to mass spectrometry (HDX-MS)

Background: Phosducin is a conserved regulatory phosphoprotein involved in phototransduction whose function is regulated in the 14-3-3-dependent manner.

Results: The 14-3-3 protein binding affects the structure and the accessibility of several regions within both domains of phosphorylated phosducin.

Conclusion: The 14-3-3 protein sterically occludes whole G_iβγ binding interface of phosducin.

Significance: Mechanistic explanation for the 14-3-3-dependent inhibition of phosducin function.

SUMMARY

Phosducin (Pdc), a highly conserved phosphoprotein involved in the regulation of retinal phototransduction cascade, transcriptional control, and modulation of blood pressure, is controlled in the phosphorylation-dependent manner including the binding to the 14-3-3 protein. However, the molecular mechanism of this regulation is largely unknown. Here, the solution structure of Pdc and its interaction with the 14-3-3 protein were investigated using small angle X-ray scattering, time-resolved fluorescence spectroscopy and hydrogen-deuterium exchange coupled to mass spectrometry. The 14-3-3 protein dimer interacts with Pdc using surfaces both inside and outside its central

channel. The N-terminal domain of Pdc, where both phosphorylation sites and the 14-3-3 binding motifs are located, is intrinsically disordered protein which reduces its flexibility in several regions without undergoing dramatic disorder-to-order transition upon binding to 14-3-3. Our data also indicate that the C-terminal domain of Pdc interacts with the outside surface of the 14-3-3 dimer through region involved in G_iβγ binding. In conclusion, we show that the 14-3-3 protein interacts with and sterically occludes both the N- and C-terminal G_iβγ binding interfaces of phosphorylated Pdc, thus providing a mechanistic explanation for the 14-3-3-dependent inhibition of Pdc function.

Phosducin (Pdc) is a highly conserved phosphoprotein involved in the regulation of visual signal transduction, the transcriptional control, the regulation of transmission at the photoreceptor-to-ON-bipolar cell synapse, and the modulation of sympathetic activity and blood pressure (1-5). Other members of the Pdc protein family, Pdc-like proteins, act as co-chaperons and assist in the folding of a variety of proteins (reviewed by (6)). The function of Pdc is best understood in the modulation of light-induced processes in rod photoreceptor cells where Pdc assists in the process of shutting down rod responsiveness during prolonged exposure to

intense light. Pdc binds to the complex of $\beta\gamma$ subunits of the retinal G protein transducin ($G_i\beta\gamma$), mediates its sequestration to the cytosol and prevents its re-association with the $G_i\alpha$ subunit of transducin. The binding of Pdc to the $G_i\beta\gamma$ complex is controlled through the phosphorylation of Ser⁵⁴ and Ser⁷³ by Ca²⁺/calmodulin-dependent and cAMP-dependent protein kinases (2,7-9). However, the phosphorylation of these two sites by itself has only a weak effect on Pdc binding to $G_i\beta\gamma$ in intact retina and the efficient inhibition of this interaction requires a presence of the 14-3-3 protein which associates with the phosphorylated Pdc and presumably blocks its interaction with $G_i\beta\gamma$ (9-11). The 14-3-3 proteins are highly conserved dimeric molecules that recognize specific phosphoserine/phosphothreonine-containing motifs. Through these binding interactions the 14-3-3 proteins regulate functions of other proteins by modulating their structure, masking functional sites on their surfaces or promoting protein-protein interactions (reviewed by (12)). The exact role of the 14-3-3 protein binding in Pdc regulation is, however, still unclear mainly due to the lack of structural data.

The structural analysis of the Pdc: $G_i\beta\gamma$ complex revealed that Pdc consists of two separate domains that are both involved in binding to $G_i\beta\gamma$ (Fig. 1A) (13,14). Whereas the mostly helical N-terminal domain (Pdc-ND) constitutes the main part of Pdc's interaction surface with $G_i\beta\gamma$ (~65% of the total binding surface) and is responsible for competing with $G_i\alpha$ for $G_i\beta\gamma$, the C-terminal domain (Pdc-CD) possesses the thioredoxin-like fold and seems to be responsible for blocking the interaction of $G_i\beta\gamma$ with the membrane. These structural studies also suggested that Pdc-ND is highly flexible, especially in regions where it does not contact $G_i\beta\gamma$, and in its free state lacks an explicit native conformation in contrast to the helical conformation observed in the complex with $G_i\beta\gamma$. Phosphorylation sites Ser⁵⁴ and Ser⁷³, which control the binding of Pdc to $G_i\beta\gamma$, are both located within Pdc-ND and it has been shown that their simultaneous phosphorylation is required for a stable complex formation between phosphorylated Pdc (pPdc) and the 14-3-3 ζ protein (15). This suggested that phosphorylation of Ser⁵⁴ and Ser⁷³ creates two 14-3-3 binding motifs that are used simultaneously to engage both ligand binding grooves within the 14-3-3 ζ protein dimer. The presence of both 14-3-3

binding motifs within Pdc-ND also indicates that this domain constitutes the main part of Pdc's interaction surface with the 14-3-3 protein, which might thus either sterically block the Pdc's $G_i\beta\gamma$ binding surface and/or change its structure. We have recently shown, using time-resolved dansyl fluorescence spectroscopy, that the 14-3-3 ζ protein binding reduces the segmental dynamics within several regions of dansyl-labeled pPdc molecule, suggesting that pPdc undergoes a conformational change upon the binding to 14-3-3 ζ (15). These changes involve parts of the $G_i\beta\gamma$ binding surface of Pdc-ND, thus supporting the inhibitory role of the 14-3-3 protein in Pdc binding to $G_i\beta\gamma$. In addition, it has also been speculated that the 14-3-3 protein binding decreases the rate of Pdc dephosphorylation after a light stimulus by virtue of its interaction with phosphorylated Ser⁵⁴ and Ser⁷³, thus lengthening the time that Pdc remains phosphorylated after a light exposure, and/or stabilizes the N-terminal domain and protects phosphorylated Pdc from degradation (9). Yet another role for the 14-3-3 protein binding might be in the regulation of Pdc interaction with other proteins including the SUG1 subunit of the proteasome complex and the transcription factor CRX (3,16). More detailed structural data on Pdc, of which unbound (apo) structure is unknown, and its complex with the 14-3-3 protein are clearly needed to better understand the role of 14-3-3 in the regulation of Pdc function.

Here we use small angle X-ray scattering (SAXS), time-resolved fluorescence spectroscopy, quenching of tryptophan fluorescence, hydrogen-deuterium exchange kinetics coupled with mass spectrometry (HDX-MS) and other biophysical approaches to investigate the solution structure of apo Pdc and its interaction with the 14-3-3 ζ protein.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Expression, Purification and Phosphorylation of Pdc—Rat full-length Pdc (UniProt ID P20942) Q52K mutant doubly phosphorylated at Ser⁵⁴ and Ser⁷³ was prepared as described previously (15). Pdc-ND (residues 1-107) was prepared by introducing a stop codon instead of Gly¹⁰⁸ using the QuickChange Kit (Stratagene). The status of Pdc and Pdc-ND phosphorylation was examined by mass spectrometry. Pdc-CD was prepared by ligating the cDNA encoding sequence 110-246 into pET-15b (Novagen) using the NdeI and BamHI sites. The entire coding region was checked by sequencing. Both Pdc-ND and Pdc-

CD were expressed as 6×His-tagged proteins and purified using the same protocol as Pdc full-length.

Expression and Purification of 14-3-3 ζ —The mutant version of the 14-3-3 ζ protein (human isoform ζ) containing no tryptophan residues (mutations W59F and W228F, denoted as 14-3-3 ζ noW) and the C-terminally truncated 14-3-3 ζ Δ C (residues 1–230 with deleted disordered C-terminal loop) were prepared as described previously (17,18).

Dynamic light scattering (DLS)—DLS measurements were carried out as described previously (15). All measurements were performed in a buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 2 mM DTT. The Pdc full-length, Pdc-ND, and Pdc-CD concentrations were 60 μ M.

Circular Dichroism (CD) Spectroscopy—Both far- and near-UV CD spectra were measured as described previously (19). The CD measurements were conducted at 22 °C in a buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 2 mM 2-mercaptoethanol with protein concentrations 10 μ M (far-UV spectra) and 80–160 μ M (near-UV spectra).

Analytical Ultracentrifugation (AUC)—Sedimentation velocity (SV) experiments were performed using a ProteomeLab™ XL-I analytical ultracentrifuge (Beckman Coulter) as described previously (19). Samples were dialyzed against buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, and 2 mM 2-mercaptoethanol before analysis. All sedimentation profiles were recorded with absorption optics. The diffusion-deconvoluted sedimentation coefficient distributions $c(s)$ were calculated from raw absorbance data using the software package SEDFIT (20). SV analysis of interaction between full-length pPdc (pPdc-ND, Pdc-CD) and 14-3-3 ζ Δ C was performed at various loading concentrations and molar ratios; and this was followed by the integration of calculated distributions to determine the overall weight-averaged s_w -values (s_w). Constructed s_w isotherms were fitted with $A + B \rightleftharpoons AB$ model as implemented in the software package SEDPHAT with known s_w values of individual components as prior knowledge. Resulting parameters were verified and loading concentrations were corrected using global Lamm equation modeling also implemented in the SEDPHAT software (20,21).

Small Angle X-ray Scattering—SAXS data were collected on the European Molecular Biology Laboratory (EMBL) P12 beamline on the storage ring PETRA III (Deutsches Elektronen Synchrotron (DESY), Hamburg, Germany). The SAXS measurements were conducted in buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 2 mM 2-mercaptoethanol. The Pdc concentrations were 2.3, 3.4 and 4.2 mg.mL⁻¹. The data were averaged and the scattering of buffer was subtracted using PRIMUS (22). The forward scattering $I(0)$ and the radius of gyration R_g were calculated using the Guinier approximation (23). The distance distribution functions $P(r)$ and the maximum particle dimensions D_{max} were computed from the entire scattering pattern using the program GNOM (24). The solute apparent molecular mass (MM_{exp}) was estimated by comparison of the forward scattering with that from reference solutions of bovine serum albumin (molecular mass 66 kDa). *Ab initio* molecular envelopes were computed by the program DAMMIN (25). Multiple iterations of DAMMIN were averaged using the program DAMAVER (26). The analysis based on the ensemble optimization method was performed using the program EOM (27).

Time-resolved Fluorescence Measurements—Fluorescence decays were measured on an apparatus described in (28). The apparatus comprised frequency-tripled Ti:Sapphire laser (Coherent, Chameleon Ultra II) and the time-correlated single photon counting detection (Becker&Hickl, SPC150) with cooled MCP-PMT (Hamamatsu, R3809U-50). Tryptophan was excited at 298 nm, its emission was collected at 355 nm using monochromator (Horiba, H-20) with a stack of UG1 and BG40 glass filters placed in front of the input slit. ANS emission was excited and measured at 355 and 480 nm, respectively, using the monochromator with the 405 nm long-pass filter in the emission channel. Decays were accumulated under the magic-angle conditions, typically in 1024 channels and time resolution of 50 ps/channel, until 10⁷ counts per decay were reached. Samples were placed in a thermostatic holder, and all experiments were performed at 23 °C in a buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 2 mM 2-mercaptoethanol. The Pdc concentration was 30 μ M, and the 14-3-3 ζ noW protein concentration was 60 μ M. ANS fluorescence experiments were performed with 5 μ M Pdc and 20 μ M ANS.

Fluorescence was assumed to decay multiexponentially according to the formula:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \cdot \exp(-t/\tau_i), \quad (1)$$

where $\sum_i \alpha_i = 1$ and τ_i and α_i are the fluorescence lifetimes and the corresponding amplitudes, respectively. Decays were analyzed by a singular-value decomposition maximum entropy method for oversampled data (29). The program yields amplitudes, α_i , representing lifetime distributions. Typically we used 100 lifetimes equidistantly spaced in the logarithmic scale, ranging from 50 ps to 100 ns. The mean fluorescence lifetime of the whole decay was calculated from the formula:

$$\tau_{mean} = \sum_i \alpha_i \tau_i^2 / \sum_i \alpha_i \tau_i \quad (2)$$

Polarized fluorescence decays were measured with fixed emission polarizer set in the vertical position and the excitation polarization plane was rotated between 0° and 90°. In this configuration the G-factor was close to one and its value was determined in an independent experiment. Fluorescence anisotropy decays $r(t)$ were obtained by simultaneous reconvolution of parallel $I_{\parallel}(t)$ and perpendicular $I_{\perp}(t)$ decay components (30,31) using model-independent singular-value decomposition maximum entropy method that does not set prior limits on the distribution shape (29). The anisotropies $r(t)$ were assumed to decay multiexponentially:

$$r(t) = \sum_i \beta'_i \cdot \exp(-t/\phi'_i) \quad (3)$$

where amplitudes β'_i represent a distribution of the correlation times ϕ'_i ($\sum \beta'_i = r_0$) and r_0 is the initial anisotropy. We used 100 correlation times ϕ'_i equidistantly spaced in the logarithmic scale and ranging from 50 ps to 200 ns. For multimodal distributions the mean correlation time associated with the m-th peak of the distribution was calculated from the formula:

$$\phi_m = \sum_k \beta'_{m,k} \cdot \phi'_{m,k} / \sum_k \beta'_{m,k} \quad (4)$$

where index k runs over the nonzero amplitudes of the m-th peak of the distribution only. The area

of the peak represents the associated mean amplitude β_m .

Tryptophan Fluorescence Quenching Experiments—Fluorescence quenching measurements were performed at 22 °C on an ISS PC1 Photon counting spectrofluorometer, using a 1 nm bandpass on both the excitation and emission monochromators. Samples (35 μM pPdc and 70 μM 14-3-3ζnoW) were dialyzed against buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 2 mM 2-mercaptoethanol. Stern-Volmer plots were constructed using the changes in fluorescence intensity at 340 nm (with excitation at 297 nm) and fitted with the following equation:

$$I_0 / I = (1 + K_{SV}[Q])e^{V[Q]} \quad (5)$$

where I_0 is the fluorescence intensity in the absence of the quencher, I is the fluorescence intensity of the sample in the presence of the quencher with the concentration $[Q]$, K_{SV} is the Stern-Volmer constant, and V is the static quenching constant. The K_{SV} is equal to $\tau_{mean} k_q$, where k_q is the bimolecular rate constant for quenching and τ_{mean} is a mean fluorescence lifetime of the tryptophan in the absence of a quencher (32). Corrections for the inner filter effect were performed as described previously according to the equation (33):

$$I_c = I \text{ antilog}[(A_{ex} + A_{em})/2] \quad (6)$$

where I_c is the corrected fluorescence intensity, I is the measured fluorescence intensity, and A_{ex} and A_{em} are sample absorbances at the excitation and emission wavelength, respectively.

Hydrogen-Deuterium Exchange Kinetics Coupled to Mass Spectrometry (HDX-MS)—Hydrogen/deuterium exchange was followed for individual proteins alone (Pdc, pPdc, 14-3-3ζΔC) and for 2:1 molar mixture of 14-3-3ζΔC:pPdc. Concentrations of the proteins during exchange were 120 μM for 14-3-3ζΔC and 60 μM for Pdc or pPdc. HDX was started by a five-fold dilution of the proteins to deuterated buffer (20 mM Tris-HCl pD 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 10% glycerol) and aliquots of 10 μl were collected at 40 sec, 4 min, 15 min, 1 hr, 3 hr, and 8 hr of exchange. Exchange was stopped by the addition of 57 μl of 6 mM HCl and freezing in liquid nitrogen. Analysis of deuterated samples (HPLC-MS) and data processing was done as described elsewhere

(34) except for the following modifications. Injection volume was 20 μ l and shorter gradient was used, 10-25% B (95% acetonitrile/5% water/0.4% formic acid) in 5 minutes, followed by a quick step to 40% B.

RESULTS

N-Terminal Domain of Pdc is Intrinsically Disordered Protein and Adopts Highly Extended Conformation—The crystal structure of the Pdc:G β γ complex revealed that Pdc-ND comprises first 110 amino acid residues (Fig. 1A) and constitutes the main part of Pdc's interaction surface with G β γ (13,35). It has also been suggested that this domain is poorly structured in the apo-state compared to the ordered and helical conformation observed in the complex with G β γ (14). Since both regulatory phosphorylation sites and the 14-3-3 protein binding motifs (Ser⁵⁴ and Ser⁷³) are located within this presumably unstructured Pdc-ND, we first performed its detailed biophysical characterization using dynamic light scattering (DLS), analytical ultracentrifugation and fluorescence spectroscopy. The analysis of Pdc sequence using PONDR VL3 (36), DISOPRED (37), UIPRED (38) and PONDR FIT (39) predictors suggests that the majority of Pdc-ND (residues 1-101) and the very C-terminus of Pdc-CD (residues 225-246) are unstructured (Fig. 1B). Another typical feature of unstructured proteins is their low compactness. Thus, DLS measurements were performed to obtain information on the hydrodynamic radii (R_H) of Pdc and its isolated domains. The comparison of R_H reveals that Pdc-ND, although possessing smaller number of amino acid residues compared to Pdc-CD, exhibits significantly larger R_H (Table 1). Both full-length Pdc and Pdc-ND also show significantly larger R_H compared to theoretical values calculated for proteins of given molecular masses in a natively folded state (Table 1) (40). In addition, the experimental R_H of Pdc-ND is comparable with the theoretical value calculated for its guanidinium chloride-unfolded state supporting the disordered nature of this domain.

The SV AUC experiments were next performed to confirm that large values of R_H observed for Pdc and Pdc-ND were due to a non-globular structure and not their oligomerization. The normalized continuous sedimentation coefficient distributions, $c(s)$, obtained from these experiments are shown in Fig. 2A. The analysis of distributions reveals that Pdc-ND, Pdc-CD and full-length Pdc show single peaks with a weight-

averaged sedimentation coefficient (corrected to 20.0 °C and the density of water), $s_{w(20,w)}$, values of 1.5 S, 1.8 S and 2.4 S, respectively. These values of $s_{w(20,w)}$ correspond to molecular mass of ~14.4, ~18.7 and ~31.8 kDa, respectively, suggesting all three proteins are monomers in solution (theoretical M_w of Pdc-ND, Pdc-CD, and full-length Pdc are 14.64, 17.41, and 30.16 kDa, respectively).

The disordered nature of Pdc-ND is also corroborated by its CD spectra. The far-UV CD spectrum shows a large negative ellipticity in the region around 200 nm similarly to spectra of other intrinsically disordered proteins including the *Listeria monocytogenes* virulence protein ActA (41), the bovine viral diarrhea virus core protein (42) or the substrate domain of p130Cas (43) (Fig. 2B). In addition, the near-UV CD spectrum of Pdc-ND is weak and featureless suggesting its aromatic side chains have no well-defined conformation, thus corroborating the disordered state of this domain (Fig. 2C). On the other hand, the CD spectra of Pdc-CD show features of a well-folded protein containing a significant amount of secondary structure and whose aromatic side chains possess a well-defined conformation (44).

The structural differences between Pdc-ND and Pdc-CD were next studied using time-resolved fluorescence of 8-anilinonaphthalene-1-sulfonic acid (ANS). It has been shown that this hydrophobic fluorescence probe has significantly higher affinity for folded and partly-folded proteins than for the unstructured and/or unfolded ones, and thus is frequently used to study structural properties of protein molecules (45). The ANS binding to and/or into hydrophobic regions of folded or molten globular proteins is accompanied by the characteristic increase in the mean excited-state lifetime (τ_{mean}). The measured values of τ_{mean} of ANS bound to Pdc, Pdc-ND and Pdc-CD are shown in Table 1. The significantly lower value of τ_{mean} for ANS bound to Pdc-ND compared to Pdc-CD or Pdc is consistent with the expected unfolded state and the low hydrophobicity of the N-terminal domain. Thus, all these data suggest that Pdc-ND is intrinsically disordered and adopts a highly extended conformation.

Solution Structure of the Free Pdc—Since the unbound (apo) structure of Pdc is unknown, we next used the small-angle X-ray scattering (SAXS), an established technique for structural analysis of flexible systems including intrinsically disordered proteins (46), to study the

solution structure of Pdc. The Guinier analysis revealed that all Pdc samples are monodisperse as their Guinier plots are linear in the region $s \cdot R_g < 1.3$, where s is the momentum transfer and R_g is the radius of gyration (Fig. 3A). Values of the R_g calculated from the slope of the Guinier plot ($R_g = 36.5\text{--}37.0 \text{ \AA}$) suggest that the free Pdc adopts an extended state (Table 2). In comparison, the globular molecule of the 14-3-3 protein dimer (yeast isoform Bmh1) with double molecular weight has a R_g value of 32.6 \AA (47). The distance distribution functions $P(r)$ calculated from the scattering data using the program GNOM (24) are shown in Fig. 3B. The $P(r)$ functions are similarly shaped for all measured Pdc samples and show peak around 27 \AA and the maximum distance D_{max} $120\text{--}129 \text{ \AA}$ (Table 2). The elongated and highly asymmetric shape of the $P(r)$ functions corroborates the extended state of the Pdc molecule. The calculated molecular weight derived from the forward scattering intensity $I(0)$ is consistent with the expected molecular weight of the Pdc monomer (Table 2). The Kratky plot ($s^2I(s)$ vs s), which reflects the degree of compactness of the scattering particles, has a shape typical for a partially unfolded protein with flat peak at low s and an increase in $s^2I(s)$ in the larger s range (Fig. 3C) (48,49).

Two different approaches were used to model the solution structure of free Pdc. First, the low resolution *ab initio* envelope of Pdc was calculated using DAMMIN (25). The final envelope consists of an average of 10 individual reconstructions and the individual envelopes agreed well with each other (the mean value of normalized spatial discrepancy, NSD, was 0.52 ± 0.03). The obtained *ab initio* envelope of Pdc possesses a rod like extended shape with one end being narrower than the other (Fig. 3D). The size of the narrower smaller part corresponds well with the size of Pdc-CD, suggesting that the larger and wider part represents the disordered N-terminal domain. However, the validity of such *ab initio* reconstruction for disordered proteins which describes a highly flexible structure using one conformation is uncertain, although useful to visualize a diffuse nature of disordered molecule (46,50). Therefore, we next used a more appropriate approach based on the ensemble optimization method (EOM) (27). The C-terminal domain of Pdc (residues 106-230) was treated as a rigid-body while the flexible N-terminal domain and the very C-terminus (residues 1-105 and 231-246, respectively) as a

chain of dummy residues. An initial pool of 10,000 Pdc models with random conformation of the N-terminal domain and the very C-terminus free of steric clashes was generated. Next, a genetic algorithm was used to select an ensemble of Pdc conformers that collectively fit the experimental SAXS data. The EOM analysis yielded an ensemble (containing 18 conformers) that fits the experimental scattering curve of Pdc ($c = 4.2 \text{ mg/mL}$) with χ^2 value of 0.98 (Fig. 4A). The comparison of the R_g distributions of the EOM-selected conformational ensemble with the initial pool is shown in Fig. 4B. As can be noticed, the R_g distribution of the EOM-selected ensemble is narrower and biased towards less compact structures when compared to the pool and it contains single peak centered around an R_g of 34.2 \AA , consistent with R_g values calculated from the scattering curves (Table 2). Very similar results were also obtained from the EOM analysis of other two Pdc samples ($c = 3.4$ and 2.3 mg/mL). The selected conformers that fit the experimental scattering curve with the lowest χ^2 value (Fig. 4C) show substantial structural variability (the mean value of NSD is 2.02), suggesting significant flexibility of the N-terminal domain. In addition, none of these conformers by itself could account for the observed Pdc scattering, as revealed by comparing the $P(r)$ curves calculated from these models with the experimental $P(r)$ curve (Fig. 4D). We also attempted to model the Pdc molecule as two rigid domains connected with the flexible linker similarly to Pdc structure observed in the Pdc:G β γ complex (13,14). However, the EOM analysis using this model yielded an ensemble that fits the experimental scattering curve of Pdc significantly worse (with χ^2 value of 1.51) compared to the model containing ordered C-terminal domain and disordered N-terminal domain (Fig. 4E). In addition, the comparison of the R_g distributions of the EOM-selected ensemble with the pool revealed that the molecule of Pdc is significantly more extended than expected from the pool simulation (Fig. 4F), indicating that the two-domain model is unable to properly describe the solution structure of free Pdc. Thus, the analysis of SAXS measurements suggests that molecules of free Pdc are monomers that possess extended conformations due to the highly flexible and unstructured N-terminal domain, in agreement with data obtained from DLS, analytical ultracentrifugation, CD spectroscopy and ANS fluorescence (Table 1 and Figs. 1 and 2).

Conformational Behavior of Pdc and its Changes upon the Phosphorylation and the 14-3-3 ζ Binding—The time-resolved tryptophan fluorescence intensity and anisotropy decay measurements were next used to investigate the conformational behavior of Pdc and its changes upon the phosphorylation and the 14-3-3 ζ binding. Four Pdc mutants containing a single tryptophan residue at four different positions (Trp⁹³, Trp¹⁰⁷, Trp¹²³, and Trp²⁰⁸) were prepared to sample various regions of the Pdc molecule. Residues Trp⁹³ and Trp¹⁰⁷ are located within Pdc-ND while Trp¹²³ and Trp²⁰⁸ within Pdc-CD (Fig. 1A). The sequence of Pdc contains only one tryptophan residue at position 29; thus, this residue was mutated to Phe and tryptophan was inserted into selected positions (mutations Y93W, F107W, F123W, F208W). The human 14-3-3 ζ noW protein mutant missing all Trp residues (mutations W59F and W228F) was used in all tryptophan fluorescence measurements. We previously showed that these two mutations have no effect on the binding properties of the 14-3-3 ζ protein (17,51). Time-resolved fluorescence intensity and anisotropy decays were analyzed using a singular-value decomposition maximum entropy method as described previously (29). Since the tryptophan residue frequently exhibits complicated multiexponential decays whose detailed interpretation is often impossible (52,53), we decided to use a mean fluorescence lifetime (τ_{mean}) as a robust qualitative indicator of changes in the microenvironments of inserted Trp residues (Table 3 and Fig. 5). For the sake of comparison, this table also contains previously obtained data for residue Trp²⁹ (15). As can be noticed, phosphorylation by itself decreased τ_{mean} of Trp⁹³, Trp¹²³ and Trp²⁰⁸, with the effect being surprisingly strongest for Trp²⁰⁸ (Fig. 5A). The reduced τ_{mean} can be interpreted as increased contacts with the polar environment and/or altered quenching interactions in the vicinity of these residues, suggesting that in the apo-state both domains interact with each other and the phosphorylation of Ser⁵⁴ and Ser⁷³ within Pdc-ND affects this interaction. On the other hand, the interaction between pPdc and 14-3-3 ζ noW significantly increased τ_{mean} of tryptophans Trp²⁹, Trp⁹³ and Trp²⁰⁸ (Fig. 5B). This could be the result of either the 14-3-3-induced conformational change of pPdc, which affects interaction of these residues with their surroundings, and/or a direct interaction of 14-3-3 ζ noW with these residues, reducing their

contacts with the polar environment or altering quenching interactions in their vicinity.

It is reasonable to assume that such interactions would also affect the mobility and/or the accessibility of these residues. Thus we next studied segmental motions of inserted tryptophans using the polarized time-resolved emission measurements (Table 3 and Fig. 5). The fluorescence anisotropy decays of all five tryptophans revealed three classes of correlation times. Short correlation times located around 0.3–0.9 ns (β_1) and 1.4–3.0 ns (β_2) reflect the fast local motions of tryptophan residues while the third correlation time, ϕ_3 , likely reflects the rotational diffusion of the whole molecule. Changes in the extent of segmental motion of inserted tryptophans can be judged from the change in the sum of amplitudes of fast anisotropy decay components β_{short} ($\beta_{short} = \beta_1 + \beta_2$) (15). Since $\beta_3 = r_0 - \beta_1 - \beta_2 = r_0 - \beta_{short}$, Eq. 3, where r_0 is a constant (33), it is advantageous to evaluate the internal motion from the change of β_3 because it can be assessed with better accuracy than β_{short} . As seen from the equation, lower β_3 indicates larger extent of the internal protein mobility and vice versa. The obtained increase in β_3 revealed that the 14-3-3 ζ noW binding substantially decreased segmental motions of Trp²⁹ and Trp⁹³ from pPdc-ND and, to a lesser extent, Trp²⁰⁸ from pPdc-CD (Table 3, Fig. 5B). These changes suggest suppressed segmental flexibility of regions where these Trp residues are located, presumably through direct physical contacts. The phosphorylation by itself significantly affected only the region containing Trp²⁹ which is more flexible upon the modification whereas the mobility of other tryptophans was not significantly affected (Fig. 5A). The suggested steric shielding of several Trp residues by the 14-3-3 ζ noW binding should also change their accessibility to the solute quencher. Thus, we next performed acrylamide quenching to test this hypothesis. Table 4 shows values of the bimolecular quenching constant, k_q , that were obtained by fitting the Stern-Volmer plots using Eq. 5. As can be noticed, the accessibility of Trp²⁹, Trp⁹³, Trp¹⁰⁷ and, to a lesser extent, Trp²⁰⁸ to the acrylamide significantly decreases in the pPdc:14-3-3 ζ noW complex. The accessibility of Trp¹²³ to the solvent remains unaltered. In agreement with the fluorescence lifetime data, the quenching experiments indicated for pPdc lower accessibility of Trp²⁹, Trp⁹³, and Trp¹⁰⁷ from

pPdc-ND and Trp²⁰⁸ from pPdc-CD in the presence of 14-3-3 ζ noW, thus supporting involvement of segments containing these residues in binding to 14-3-3 ζ .

Analysis of interaction between pPdc and 14-3-3 ζ using SV AUC—The AUC was next used to further investigate the interaction between pPdc and 14-3-3 ζ . Similarly as in our previous study, we used in these experiments the 14-3-3 ζ protein deleted of its C-terminal 15 residues to increase the stability of the pPdc:14-3-3 ζ complex (15). This region functions as an autoinhibitor of 14-3-3:ligand interactions and is disordered in all available crystal structures of the 14-3-3 proteins (17,51,54). A similar approach was also used by Ottmann et al. (55) to stabilize the interaction between 14-3-3 and plant plasma membrane H⁺-ATPase. A range of different molar ratios between full-length pPdc (or pPdc-ND and Pdc-CD) and 14-3-3 ζ were examined using SV AUC. Analysis of the isotherm of weight-averaged s_w values (s_w isotherm) as a function of pPdc concentration revealed the best-fit apparent equilibrium dissociation constant (K_D) of 7 ± 3 μ M using a 1:1 (one molecule of pPdc and one 14-3-3 ζ dimer) Langmuir binding model (Fig. 6A). Interestingly, the analysis of the s_w isotherm determined over a range of different molar ratios between pPdc-ND and 14-3-3 ζ revealed that pPdc-ND exhibits slightly higher binding affinity for 14-3-3 ζ compared with the full-length pPdc with the best-fit K_D of 3 ± 2 μ M (Fig. 6B). On the other hand, the s_w isotherm for Pdc-CD revealed no significant binding interaction with 14-3-3 ζ (Fig. 6C) suggesting that the phosphorylation-dependent interaction between pPdc-ND and 14-3-3 ζ is responsible for the stability of the pPdc:14-3-3 ζ complex. In addition, the higher binding affinity observed for pPdc-ND compared to full-length pPdc is consistent with our suggestion that both domains interact with each other (based on results of time-resolved tryptophan fluorescence, Fig. 5A), as the removal of Pdc-CD can increase the accessibility of phosphorylated motifs within pPdc-ND.

Mapping of the interactions between pPdc and 14-3-3 ζ using HDX-MS—Next, HDX-MS was used to map the protein–protein interactions between pPdc and 14-3-3 ζ . The HDX kinetics of the complex as well as free 14-3-3 ζ , pPdc, and Pdc proteins were measured. The exchange kinetics of 14-3-3 ζ was followed on 121 peptides covering 100 % of the sequence while 87 peptides were used in the case of Pdc also

covering the entire sequence. The exchange kinetics profile of Pdc alongside the sequence (Fig. 7A) revealed that the N-terminal half of Pdc molecule exhibits relatively fast deuteration kinetics reflecting its disordered and highly flexible character (Fig. 7B), whereas the C-terminal half is characterized by exchange curves typical for structured protein regions (Fig. 7C). In general, phosphorylation does not induce differences in solvent accessibility and/or hydrogen bonding except for three regions of Pdc molecule where significant changes were observed. The first region, around the phosphorylation motif (delimited here by the peptide 51-76), exhibits higher deuteration upon phosphorylation, which can be interpreted as better accessibility of this part of Pdc. On the other hand, the second region (peptide 152-157) and the third one (e.g. peptide 213-223) show protection of Pdc against deuterium exchange upon phosphorylation. This change in deuteration kinetics is consistent with the existence of contacts between Pdc-CD and Pdc-ND as also suggested by SAXS and time-resolved fluorescence measurements. The HDX for pPdc in the presence of 14-3-3 ζ revealed no significant changes in deuteration kinetics considering the errors of the experiment. This insensitivity of pPdc backbone amide hydrogens to changes in deuteration kinetics upon the binding to 14-3-3 ζ might be caused either by the highly flexible character of Pdc-ND as such regions undergo a very fast deuteration kinetics that is less sensitive to protein-protein interactions or by the predominantly electrostatic and side chain-mediated interactions between these two proteins. A similar effect was also observed, for example, for phosphorylated RGS3 in the complex with 14-3-3 ζ (56) or the heteromeric complex containing UBC9 and SUMO-1 (57). On the other hand, several regions of 14-3-3 ζ (sequences 46–59, 155–174, 191–196) exhibited significant decrease in deuterium incorporation upon the pPdc:14-3-3 ζ complex formation (Figs. 8A and 8B). This slower exchange kinetics can be interpreted as lower solvent exposure and/or the change in hydrogen bonding following the binding to pPdc, thus suggesting that protected regions of 14-3-3 ζ (or their parts) form the binding interface. Furthermore, as can be noticed from Fig. 8C, these regions map not only to the surface of the ligand binding groove formed by helices H3, H5, H7 but also to the surface formed by helices H6 and H8 outside the central channel

similarly as has been observed in the RGS3:14-3-3 ζ and the Nth1:Bmh1 complexes (47,56,58). Surprisingly, the C-terminal part of helix H9 (peptide 220-227) showed opposite trend as the 14-3-3 ζ in complex with pPdc became more accessible for deuteration. However this effect vanished later during the exchange reflecting dynamic behavior of this region.

DISCUSSION

The main aim of the current study is to provide a mechanistic insight into the regulation of Pdc by means of the 14-3-3-protein binding. Bioinformatics analysis revealed that more than 90% of the 14-3-3 binding partners contain intrinsically disordered segments and the majority of the high-affinity 14-3-3 binding motifs are located within these disordered regions (59,60). The presence of the 14-3-3 binding motifs within flexible regions likely uncouples the binding strength from the specificity and renders these phosphorylation-dependent and highly specific interactions reversible. Structural studies of the Pdc:G β \gamma complex suggested that Pdc is not an exception because Pdc-ND has been found to be highly flexible and poorly structured (13,14). Theoretical prediction as well as biophysical characterization clearly showed that Pdc-ND, in contrast to the folded and compact Pdc-CD, is intrinsically unstructured and adopts a highly extended conformation (Figs. 1 and 2 and Table 1). The disordered and highly flexible nature of Pdc-ND was also confirmed by SAXS analysis which revealed that solution structure of Pdc is best described as an ensemble of structurally variable conformers consisting of rigid Pdc-CD and flexible Pdc-ND (Figs. 3 and 4 and Table 2). In addition, Pdc-ND of unbound (apo) Pdc is significantly more extended compared to the conformation observed in the crystal structure of the Pdc:G β \gamma complex (Fig. 4).

HDX-MS measurements revealed no dramatic disorder-to-order transition upon the pPdc binding to 14-3-3 ζ , as no significant changes in deuteration kinetics of pPdc peptides were observed in the presence of 14-3-3 ζ . However, small but significant reduction of flexibility was detected by time-resolved fluorescence measurements in regions containing Trp²⁹, Trp⁹³ from Pdc-ND and Trp²⁰⁸ from Pdc-CD (Fig. 5 and Table 3). Consistently, we also observed increase in τ_{mean} as well as decrease in the accessibility of these three tryptophan residues

upon the complex formation (Tables 3 and 4) suggesting interaction between 14-3-3 ζ and Pdc regions containing these residues. In contrast to Pdc, the 14-3-3 ζ dimer offers a rigid and well defined binding surface as several peptides located both inside and outside the central channel exhibited significant decrease in deuterium incorporation upon the complex formation (Fig. 8). Therefore, it is reasonable to assume that pPdc-ND containing both phosphorylation sites binds into the central channel of 14-3-3 ζ while Pdc-CD interacts with regions located outside the central channel of the 14-3-3 ζ dimer through the side containing Trp²⁰⁸ (Fig. 9) as this residue showed lower accessibility upon the complex formation while the accessibility of Trp¹²³ remained unaltered (Table 4).

SV AUC measurements revealed that pPdc-ND is responsible for the stability of the pPdc:14-3-3 ζ complex as no significant binding was observed between the isolated Pdc-CD and 14-3-3 ζ (Fig. 6). This suggests that the interaction between 14-3-3 ζ and Pdc-CD is enabled by means of the local concentration effect upon the docking of pPdc-ND into the central channel of 14-3-3 ζ . In this respect, the pPdc:14-3-3 ζ complex resembles many other 14-3-3 protein complexes where the key interaction for protein association is the coordination of phosphorylated residue(s) and the interactions with regions remote from the phosphorylated 14-3-3 binding motif(s) by themselves are insufficient for stable complex formation. For example, associations of 14-3-3 with serotonin N-acetyltransferase (61), yeast neutral trehalase Nth1 (62), or forkhead transcription factor FOXO4 (63) are fully dependent on the phosphorylation of the 14-3-3 binding motif(s) despite extensive interactions beyond those involving the phosphorylated motifs and the 14-3-3 binding grooves.

The Pdc-ND constitutes the larger part of Pdc's interaction interface with G β \gamma whereas Pdc-CD seems to be responsible for blocking the interaction of G β \gamma with the membrane (13,14). Thus, the binding interaction between 14-3-3 ζ and pPdc-ND might either sterically block the Pdc's G β \gamma binding surface and change its structure as well as decrease the rate of Pdc dephosphorylation after a light stimulus by virtue of its interaction with phosphorylated residues (9). In addition, contacts between 14-3-3 ζ and the region containing Trp²⁰⁸ suggest that the 14-3-3 ζ

binding might also affect the C-terminal part of $G_i\beta\gamma$ binding interface of pPdc (Fig. 1A) (13).

Taken together, the 14-3-3 protein dimer interacts with Pdc using surfaces both inside and outside its central channel. The N-terminal domain of Pdc, where both phosphorylation sites and the 14-3-3 binding motifs are located, is intrinsically disordered protein which reduces its flexibility in several regions without undergoing dramatic disorder-to-order transition upon binding to 14-3-3. Our data also indicate that the C-terminal domain of Pdc interacts with the

outside surface of the 14-3-3 dimer through region involved in $G_i\beta\gamma$ binding. Therefore, we show that the 14-3-3 protein interacts with and sterically occludes both the N- and C-terminal $G_i\beta\gamma$ binding interfaces of phosphorylated Pdc, thus providing a mechanistic explanation for the 14-3-3-dependent inhibition of Pdc function.

REFERENCES

1. Lee, R. H., Lieberman, B. S., and 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
2. Bauer, P. H., Muller, S., Puzicha, M., Pippig, S., Obermaier, B., Helmreich, E. J., and Lohse, M. J. (1992) Phosducin is a protein kinase A-regulated G-protein regulator. *Nature* **358**, 73-76
3. Zhu, X., and Craft, C. M. (2000) Modulation of CRX transactivation activity by phosducin isoforms. *Mol Cell Biol* **20**, 5216-5226
4. Herrmann, R., Lobanova, E. S., Hammond, T., Kessler, C., Burns, M. E., Frishman, L. J., and Arshavsky, V. Y. (2010) Phosducin regulates transmission at the photoreceptor-to-ON-bipolar cell synapse. *J Neurosci* **30**, 3239-3253
5. Beetz, N., Harrison, M. D., Brede, M., Zong, X., Urbanski, M. J., Sietmann, A., Kaufling, J., 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., and Hein, L. (2009) Phosducin influences sympathetic activity and prevents stress-induced hypertension in humans and mice. *J Clin Invest* **119**, 3597-3612
6. Willardson, B. M., and Howlett, A. C. (2007) Function of phosducin-like proteins in G protein signaling and chaperone-assisted protein folding. *Cell Signal* **19**, 2417-2427
7. Lee, R. H., Lieberman, B. S., Yamane, H. K., Bok, D., and Fung, B. K. (1992) A third form of the G protein beta subunit. 1. Immunochemical identification and localization to cone photoreceptors. *J Biol Chem* **267**, 24776-24781
8. Yoshida, T., Willardson, B. M., Wilkins, J. F., Jensen, G. J., Thornton, B. D., and Bitensky, M. W. (1994) The phosphorylation state of phosducin determines its ability to block transducin subunit interactions and inhibit transducin binding to activated rhodopsin. *J Biol Chem* **269**, 24050-24057
9. 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., and Willardson, B. M. (2001) Modulation of the G protein regulator phosducin by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation and 14-3-3 protein binding. *J Biol Chem* **276**, 23805-23815
10. Nakano, K., Chen, J., Tarr, G. E., Yoshida, T., Flynn, J. M., and 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
11. Lee, B. Y., Thulin, C. D., and 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
12. Obsil, T., and Obsilova, V. (2011) Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Semin Cell Dev Biol* **22**, 663-672
13. Gaudet, R., Bohm, A., and 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

14. Gaudet, R., Savage, J. R., McLaughlin, J. N., Willardson, B. M., and Sigler, P. B. (1999) A molecular mechanism for the phosphorylation-dependent regulation of heterotrimeric G proteins by phosducin. *Mol Cell* **3**, 649-660
15. Rezacikova, L., Kacirova, M., Sulc, M., Herman, P., Vecer, J., Stepanek, M., Obsilova, V., and Obsil, T. (2012) Structural modulation of phosducin by phosphorylation and 14-3-3 protein binding. *Biophys J* **103**, 1960-1969
16. Zhu, X., and Craft, C. M. (1998) Interaction of phosducin and phosducin isoforms with a 26S proteasomal subunit, SUG1. *Mol Vis* **4**, 13
17. Obsilova, V., Herman, P., Vecer, J., Sulc, M., Teisinger, J., and 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
18. Obsilova, V., Nedbalkova, E., Silhan, J., Boura, E., Herman, P., Vecer, J., Sulc, M., Teisinger, J., Dyda, F., and Obsil, T. (2008) The 14-3-3 protein affects the conformation of the regulatory domain of human tyrosine hydroxylase. *Biochemistry* **47**, 1768-1777
19. Kosek, D., Kylarova, S., Psenakova, K., Rezacikova, L., Herman, P., Vecer, J., Obsilova, V., and Obsil, T. (2014) Biophysical and structural characterization of the thioredoxin-binding domain of protein kinase ASK1 and its interaction with reduced thioredoxin. *J Biol Chem* **289**, 24463-24474
20. Schuck, P. (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J* **78**, 1606-1619
21. Dam, J., Velikovskiy, C. A., Mariuzza, R. A., Urbanke, C., and Schuck, P. (2005) Sedimentation velocity analysis of heterogeneous protein-protein interactions: Lamm equation modeling and sedimentation coefficient distributions $c(s)$. *Biophys J* **89**, 619-634
22. Roessle, M. W., Klaering, R., Ristau, U., Robrahn, B., Jahn, D., Gehrmann, T., Konarev, P., Round, A., Fiedler, S., Hermes, C., and Svergun, D. (2007) Upgrade of the small-angle X-ray scattering beamline X33 at the European Molecular Biology Laboratory, Hamburg. *J Appl Crystallogr* **40**, S190-S194
23. Guinier, A. (1939) La diffraction des rayons X aux très faibles angles: Applications à l'étude des phénomènes ultra-microscopiques. *Ann. Phys.-Paris* **12**, 161-237
24. Svergun, D. I. (1992) Determination of the Regularization Parameter in Indirect-Transform Methods Using Perceptual Criteria. *J Appl Crystallogr* **25**, 495-503
25. Svergun, D. I. (1999) Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys J* **76**, 2879-2886
26. Volkov, V. V., and Svergun, D. I. (2003) Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *J Appl Crystallogr* **36**, 860-864
27. Bernado, P., Mylonas, E., Petoukhov, M. V., Blackledge, M., and Svergun, D. I. (2007) Structural characterization of flexible proteins using small-angle X-ray scattering. *J Am Chem Soc* **129**, 5656-5664
28. Vecer, J., Vesela, P., Malinsky, J., and Herman, P. (2014) Sphingolipid levels crucially modulate lateral microdomain organization of plasma membrane in living yeast. *FEBS Lett* **588**, 443-449
29. Vecer, J., and Herman, P. (2011) Maximum Entropy Analysis of Analytically Simulated Complex Fluorescence Decays. *Journal of Fluorescence* **21**, 873-881
30. Cross, A. J., and Fleming, G. R. (1984) Analysis of time-resolved fluorescence anisotropy decays. *Biophys J* **46**, 45-56
31. Gilbert, C. W. (1983) A vector method for the non-linear least squares reconvolution-and-fitting analysis of polarized fluorescence decay data. in *Time-resolved fluorescence spectroscopy in biochemistry and biology* (Cundall, R. B., and Dale, R. E. eds.), Plenum Press, New York. pp 605-606
32. Eftink, M. R., and Ghiron, C. A. (1976) Exposure of Tryptophanyl Residues in Proteins - Quantitative-Determination by Fluorescence Quenching Studies. *Biochemistry* **15**, 672-680
33. Lakowicz, J. R. (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy, Second edition*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York

34. Trcka, F., Durech, M., Man, P., Hernychova, L., Muller, P., and Vojtesek, B. (2014) The assembly and intermolecular properties of the Hsp70-Tomm34-Hsp90 molecular chaperone complex. *J Biol Chem* **289**, 9887-9901
35. Loew, A., Ho, Y. K., Blundell, T., and Bax, B. (1998) Phosducin induces a structural change in transducin beta gamma. *Structure* **6**, 1007-1019
36. Obradovic, Z., Peng, K., Vucetic, S., Radivojac, P., Brown, C. J., and Dunker, A. K. (2003) Predicting intrinsic disorder from amino acid sequence. *Proteins* **53 Suppl 6**, 566-572
37. Ward, J. J., Sodhi, J. S., McGuffin, L. J., Buxton, B. F., and Jones, D. T. (2004) Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *J Mol Biol* **337**, 635-645
38. Dosztanyi, Z., Csizmok, V., Tompa, P., and Simon, I. (2005) IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics* **21**, 3433-3434
39. Xue, B., Dunbrack, R. L., Williams, R. W., Dunker, A. K., and Uversky, V. N. (2010) PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochim Biophys Acta* **1804**, 996-1010
40. Uversky, V. N. (2002) What does it mean to be natively unfolded? *Eur J Biochem* **269**, 2-12
41. Footer, M. J., Lyo, J. K., and Theriot, J. A. (2008) Close packing of *Listeria monocytogenes* ActA, a natively unfolded protein, enhances F-actin assembly without dimerization. *J Biol Chem* **283**, 23852-23862
42. Murray, C. L., Marcotrigiano, J., and Rice, C. M. (2008) Bovine viral diarrhea virus core is an intrinsically disordered protein that binds RNA. *J Virol* **82**, 1294-1304
43. Hotta, K., Ranganathan, S., Liu, R., Wu, F., Machiyama, H., Gao, R., Hirata, H., Soni, N., Ohe, T., Hogue, C. W., Madhusudhan, M. S., and Sawada, Y. (2014) Biophysical properties of intrinsically disordered p130Cas substrate domain--implication in mechanosensing. *PLoS computational biology* **10**, e1003532
44. Woody, R. W. (2010) Circular Dichroism of Intrinsically Disordered Proteins. in *Instrumental Analysis of Intrinsically Disordered Proteins: Assessing Structure and Conformation* (Uversky, V. N., and Longhi, S. eds.), John Wiley & Sons, Hoboken, NJ. pp 303-321
45. Uversky, V. N., Winter, S., and Lober, G. (1996) Use of fluorescence decay times of 8-ANS-protein complexes to study the conformational transitions in proteins which unfold through the molten globule state. *Biophys Chem* **60**, 79-88
46. Bernado, P., and Svergun, D. I. (2012) Structural analysis of intrinsically disordered proteins by small-angle X-ray scattering. *Mol Biosyst* **8**, 151-167
47. Kopecka, M., Kosek, D., Kukacka, Z., Rezacikova, L., Man, P., Novak, P., Obsil, T., and Obsilova, V. (2014) Role of the EF-hand-like motif in the 14-3-3 protein-mediated activation of yeast neutral trehalase Nth1. *J Biol Chem* **289**, 13948-13961
48. Putnam, C. D., Hammel, M., Hura, G. L., and Tainer, J. A. (2007) X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q Rev Biophys* **40**, 191-285
49. Mertens, H. D., and Svergun, D. I. (2010) Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *J Struct Biol* **172**, 128-141
50. Bernado, P. (2010) Effect of interdomain dynamics on the structure determination of modular proteins by small-angle scattering. *Eur Biophys J* **39**, 769-780
51. Silhan, J., Obsilova, V., Vecer, J., Herman, P., Sulc, M., Teisinger, J., and 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
52. Bajzer, Z., and Prendergast, F. G. (1993) A model for multiexponential tryptophan fluorescence intensity decay in proteins. *Biophys J* **65**, 2313-2323
53. Chen, Y., and Barkley, M. D. (1998) Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry* **37**, 9976-9982
54. Truong, A. B., Masters, S. C., Yang, H., and Fu, H. (2002) Role of the 14-3-3 C-terminal loop in ligand interaction. *Proteins* **49**, 321-325
55. Ottmann, C., Marco, S., Jaspert, N., Marcon, C., Schauer, N., Weyand, M., Vandermeeren, C., Duby, G., Boutry, M., Wittinghofer, A., Rigaud, J. L., and 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
56. Rezaczkova, L., Man, P., Novak, P., Herman, P., Vecer, J., Obsilova, V., and 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
 57. Engen, J. R. (2003) Analysis of protein complexes with hydrogen exchange and mass spectrometry. *Analyst* **128**, 623-628
 58. Macakova, E., Kopecka, M., Kukacka, Z., Veisova, D., Novak, P., Man, P., Obsil, T., and Obsilova, V. (2013) Structural basis of the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. *Biochim Biophys Acta* **1830**, 4491-4499
 59. Bustos, D. M. (2012) The role of protein disorder in the 14-3-3 interaction network. *Mol Biosyst* **8**, 178-184
 60. Collins, M. O., Yu, L., Campuzano, I., Grant, S. G., and Choudhary, J. S. (2008) Phosphoproteomic analysis of the mouse brain cytosol reveals a predominance of protein phosphorylation in regions of intrinsic sequence disorder. *Mol Cell Proteomics* **7**, 1331-1348
 61. Obsil, T., Ghirlando, R., Klein, D. C., Ganguly, S., and 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
 62. Veisova, D., Macakova, E., Rezaczkova, L., Sulc, M., Vacha, P., Sychrova, H., Obsil, T., and 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
 63. Obsil, T., Ghirlando, R., Anderson, D. E., Hickman, A. B., and Dyda, F. (2003) Two 14-3-3 binding motifs are required for stable association of Forkhead transcription factor FOXO4 with 14-3-3 proteins and inhibition of DNA binding. *Biochemistry* **42**, 15264-15272
 64. Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gambelin, S. J., Smerdon, S. J., and Cantley, L. C. (1997) The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* **91**, 961-971
 65. Eftink, M. R., and Ghiron, C. A. (1976) Fluorescence Quenching of Indole and Model Micelle Systems. *J Phys Chem* **80**, 486-493

FOOTNOTES

This work was supported by the Czech Science Foundation (Project P305/11/0708), Grant Agency of Charles University (Project 793913); and Czech Academy of Sciences (Research Projects RVO: 67985823 of the Institute of Physiology). Mass spectrometry facility was supported from project CZ.2.16/3.1.00/24023. We also acknowledge the use of analytical ultracentrifuge in CEITEC - Central European Institute of Technology in Brno, Czech Republic.

The abbreviations used are: ANS, 8-anilino-naphthalene-1-sulfonic acid; AUC, analytical ultracentrifugation; CD, circular dichroism; DLS, dynamic light scattering; HDX-MS, hydrogen-deuterium exchange coupled to mass spectrometry; Pdc, phosducin; pPdc, phosphorylated phosducin; Pdc-ND, N-terminal domain of Pdc; pPdc-ND, phosphorylated N-terminal domain of Pdc; Pdc-CD, C-terminal domain of Pdc; SAXS, small angle X-ray scattering; SV, sedimentation velocity.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. N-terminal domain of unbound (apo) Pdc is inherently disordered. (A) The crystal structure of the Pdc:G_iβγ complex (13). The G_iβγ complex and Pdc are shown in grey and light brown, respectively. Phosphorylation sites Ser⁵⁴ and Ser⁷³ are shown in red. Residues that were mutated to prepare single-Trp containing mutants of Pdc are shown in green. (B) Bioinformatics analysis using PONDR VL3 (36), DISOPRED (37), UIPRED (38) and PONDR FIT (39) predictors suggests that the majority of Pdc-ND (residues 1-101) and the very C-terminus of Pdc-CD (residues 225-246) are unstructured. The position of both phosphorylation sites/the 14-3-3 protein binding motifs is shown on top.

FIGURE 2. Biophysical characterization of Pdc domains. (A) Normalized continuous distribution of sedimentation coefficients, $c(s)$, for Pdc full-length, Pdc-CD, and Pdc-ND. (B) The comparison of the far-UV CD spectra of Pdc full-length, Pdc-CD, and Pdc-ND. (C) The comparison of the near-UV CD spectra of Pdc full-length, Pdc-CD, and Pdc-ND.

FIGURE 3. Structural characterization of Pdc by SAXS. (A) Scattering intensity as a function of the scattering vector s ($s = 4\pi\sin(\theta)/\lambda$, where 2θ is the scattering angle and λ is the wavelength). Inset shows Guinier plot of Pdc at concentration 4.2 mg/mL. (B) Distance distribution function $P(r)$. (C) The Kratky plot, which reflects the degree of compactness of the scattering particles, has a shape typical for a partially unfolded protein with flat peak at low s and an increase in $s^2I(s)$ in the larger s range (48,49). (D) Averaged and filtered DAMMIN shape envelope of Pdc molecule. The size of the narrower smaller part corresponds well with the size of Pdc-CD, suggesting that the larger and wider part represents the disordered N-terminal domain.

FIGURE 4. EOM analysis of Pdc SAXS data. (A) Comparison of the experimental SAXS profile (shown in black) with the theoretical one (shown in red) derived from an ensemble calculated using the EOM with the Pdc model based on flexible Pdc-ND and folded Pdc-CD. The selected ensemble fits the experimental scattering curve of Pdc with $\chi^2 = 0.98$. (B) Comparison of the R_g distributions of the EOM-selected conformational ensemble (shown in red) with the initial pool (shown in blue) calculated from the model with the flexible Pdc-ND. (C) EOM-generated models of Pdc that fit the experimental scattering curve with the lowest χ^2 value. Residues from flexible parts of Pdc molecule are represented by spheres. (D) Comparison of the $P(r)$ curves calculated from EOM-generated models (shown in black, red, green and orange) with the experimental $P(r)$ curve (shown in blue). As can be noticed, none of these conformers by itself could account for the observed Pdc scattering. (E) Comparison of the experimental SAXS profile (shown in black) with the theoretical one (shown in red) derived from an ensemble calculated using the EOM with the Pdc model consisting of two rigid domains. The selected ensemble fits the experimental scattering curve of Pdc with $\chi^2 = 1.51$. (F) Comparison of the R_g distributions of the EOM-selected ensemble with the initial pool calculated from the Pdc model consisting of two rigid domains.

FIGURE 5. Change in the mean excited-state lifetime, τ_{mean} , and the overall change in amplitudes of slow anisotropy decay component β_3 of Trp²⁹, Trp⁹³, Trp¹⁰⁷, Trp¹²³, and Trp²⁰⁸. (A) Changes induced by phosphorylation of Pdc at Ser⁵⁴ and Ser⁷³. (B) Changes induced by the 14-3-3ζnoW binding to pPdc.

FIGURE 6. Sedimentation velocity ultracentrifugation. Isotherms of weight-averaged sedimentation coefficients s_w were obtained from SV AUC experiments using mixtures of 14 μM 14-3-3ζ and 0.7–70 μM full-length pPdc (A), pPdc-ND (B), and Pdc-CD (C). The insets show the sedimentation coefficient distributions $c(s)$ of 14-3-3ζ and pPdc, pPdc-ND and Pdc-CD mixtures at various molar ratios underlying the s_w data points. Mixtures with the molar ratio 20:1 (14-3-3:Pdc) are shown in black, ratio 6:1 in red, ratio 2:1 in blue, ratio 2:3 in green, and ratio 1:5 in cyan.

FIGURE 7. HDX-MS reveals regions of Pdc that are affected by phosphorylation. (A) Plot showing the deuteration levels of Pdc (shown in black) and pPdc (shown in red) after 8 hours of deuteration. The domain structure of Pdc and the position of both phosphorylation sites/the 14-3-3 ζ protein binding motifs are shown on top. (B) Graphs of HDX kinetics for two selected peptides from Pdc-ND. (C) Graphs of HDX kinetics for two selected peptides from Pdc-CD. Deuterium exchange is expressed as percentages relative to the maximum theoretical deuteration level (left vertical axis) as well as a number of exchangeable protons (right vertical axis) for selected Pdc peptide.

FIGURE 8. HDX-MS reveals regions of 14-3-3 ζ that are affected by pPdc binding. (A) Plot showing the deuteration levels of 14-3-3 ζ in the absence (shown in black) and the presence of pPdc (shown in red) after 8 hours of deuteration. The secondary structure elements of 14-3-3 ζ are shown on top. (B) Graphs representing HDX kinetics for four selected 14-3-3 ζ regions that show changed deuterium exchange kinetics upon pPdc binding. Deuterium exchange is expressed as percentages relative to the maximum theoretical deuteration level (left vertical axis) as well as a number of exchangeable protons (right vertical axis) for selected 14-3-3 ζ peptides alone (black squares) and in the presence of pPdc (red circles). (C) HDX kinetics for all 14-3-3 ζ regions that show changed deuterium exchange kinetics upon pPdc binding (shown in various colors) mapped on the surface representation of the 14-3-3 ζ structure (only one chain of the 14-3-3 ζ dimer is colored as the changes on the second one are the same) (64).

FIGURE 9. The 14-3-3 ζ protein interacts with and sterically occludes both the N- and C-terminal G β γ binding interfaces of pPdc. The 14-3-3 ζ protein and Pdc-CD are shown in light brown and violet, respectively. The 14-3-3 ζ regions that show changed deuterium exchange kinetics upon pPdc binding are colored as in Fig. 8C. The missing Pdc-ND is schematically shown as a blue dashed line. The approximate positions of phosphorylation sites Ser⁵⁴ and Ser⁷³ as well as tryptophan residues used in quenching and time-resolved fluorescence experiments are also shown. The pPdc:14-3-3 ζ complex stoichiometry (1:2) as well as the simultaneous engagement of both ligand binding grooves within the 14-3-3 ζ dimer by phosphorylated Ser⁵⁴ and Ser⁷³ are based on previously published data (15). As can be seen, the 14-3-3 ζ protein binding would sterically occlude the whole Pdc-ND as well as part of Pdc-CD. The position of Pdc-CD is based on results of tryptophan fluorescence measurements (Tables 3 and 4).

TABLE 1
Biophysical properties of Pdc full-length, Pdc-ND and Pdc-CD

	Pdc full-length	Pdc-ND	Pdc-CD
Number of residues ^a	265	126	156
Theoretical molecular mass ^b (g/mol)	30161.4	14643.2	17414.2
Experimental R_H from DLS ^c (Å)	38.4 ± 0.5	35.4 ± 0.4	26.0 ± 0.1
Theoretical R_H^d (Å) – natively folded	24.8	19.2	20.4
Theoretical R_H^d (Å) – MG	27.7	21.8	23.1
Theoretical R_H^d (Å) – NU coil	45.4	31.8	34.7
Theoretical R_H^d (Å) – NU PMG	36.8	27.5	29.5
Theoretical R_H^d (Å) – GdmCl-unfolded	51.2	34.6	38
$s_{w(20,w)}$ ^e (S)	2.4	1.5	1.8
τ_{mean} of ANS ^{f,g} (ns)	7.4	3.7	5.7

^aIncludes the N-terminal 6×His-tag.

^bCalculated from the sequence.

^cValues are the mean ± SD of five measurements.

^dTheoretical values of R_H for various conformational states were calculated according to equations reported by Uversky (40). MG, molten globule state; NU coil, natively unfolded state behaving as random coil; NU PMG, more compact natively unfolded state resembling premolten globule state; GdmCl-unfolded, unfolded state in the presence of guanidinium chloride.

^eWeight-averaged sedimentation coefficient corrected to 20.0 °C and the density of water obtained from analytical ultracentrifugation.

^fS. D. = 0.05 ns.

^gThe mean fluorescence lifetime (τ_{mean}) was calculated using Eq. 2.

TABLE 2
Structural parameters determined from SAXS data

	Pdc sample		
c (mg.mL ⁻¹)	4.2	3.4	2.3
R_g (Å) ^a	36.6 ± 0.3	37.0 ± 0.3	36.5 ± 0.4
R_g (Å) ^b	37.2 ± 0.3	37.9 ± 0.2	36.2 ± 0.3
D_{\max} (Å)	127	129	120
MM_{exp} (kDa) ^c	33 ± 1	34 ± 1	33 ± 1

^aCalculated using Guinier approximation (23).

^bCalculated using the program GNOM (24).

^cMolecular weight was estimated by comparison of the forward scattering intensity $I(0)$ with that from the reference solution of bovine serum albumin.

TABLE 3

Summary of time-resolved tryptophan fluorescence measurements of Pdc

Pdc mutant	τ_{mean} ^{a,b} (ns)	β_1 ^c	ϕ_1 ^d (ns)	β_2 ^c	ϕ_2 ^d (ns)	β_3 ^c	ϕ_3 ^d (ns)
Pdc W29	3.9	0.045	0.5	0.094	2.4	0.061	36
pPdc W29	3.8	0.057	0.4	0.102	2.7	0.043	36
pPdc W29 + 14-3-3 ζ ^e	4.2	0.028	0.4	0.067	1.8	0.108	71
Pdc W93	4.3	0.065	0.6	0.048	3.2	0.086	22
pPdc W93	4.1	0.055	0.9	0.050	3.0	0.091	23
pPdc W93P + 14-3-3 ζ	4.4	0.022	0.3	0.044	1.8	0.137	51
Pdc W107	4.9	0.034	0.3	0.045	1.6	0.122	33
pPdc W107	4.9	0.035	0.4	0.043	1.9	0.120	34
pPdc W107 + 14-3-3 ζ	5.0	0.029	0.8	0.036	1.5	0.137	54
Pdc W123	4.5	0.036	0.6			0.160	20
pPdc W123	4.3	0.031	0.4			0.170	20
pPdc W123 + 14-3-3 ζ	4.3	0.017	0.4	0.019	1.4	0.166	32
Pdc W208	4.6	0.081	0.6			0.116	15
pPdc W208	4.2	0.074	0.5			0.124	16
pPdc W208 + 14-3-3 ζ	4.4	0.047	0.8	0.013	2.2	0.142	36

^aSD < 0.05 ns.^bThe mean fluorescence lifetime (τ_{mean}) was calculated using Eq. 2.^cSD < 0.01.^dSD < 20%.^eThe human 14-3-3 ζ noW protein mutant missing all Trp residues (mutations W59F and W228F) was used in all Pdc tryptophan measurements (17,51).

TABLE 4
Results of acrylamide quenching of tryptophan fluorescence

Pdc mutant	$k_q \times (10^{-9} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})^{\text{a,b}}$	$V (\text{M}^{-1})$
pPdc W29	2.08 ± 0.06	0.29 ± 0.05
pPdc W29 + 14-3-3 ζ^{c}	1.07 ± 0.03	0.4 ± 0.4
pPdc W93	1.12 ± 0.03	0.12 ± 0.06
pPdc W93P + 14-3-3 ζ	0.73 ± 0.05	0.06 ± 0.09
pPdc W107	1.35 ± 0.04	0.34 ± 0.09
pPdc W107 + 14-3-3 ζ	0.98 ± 0.08	0.6 ± 0.2
pPdc W123	0.63 ± 0.02	0.97 ± 0.04
pPdc W123 + 14-3-3 ζ	0.67 ± 0.02	0.83 ± 0.04
pPdc W208	0.43 ± 0.07	-
pPdc W208 + 14-3-3 ζ	0.29 ± 0.01	-

^aFor comparison, bimolecular quenching constant of Trp in aqueous environment is $k_q = 5.9 \times 10^9 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (65).

^bThe bimolecular quenching constant (k_q) was calculated using Eq. 5.

^cThe human 14-3-3 ζ noW protein mutant missing all Trp residues (mutations W59F and W228F) was used in all Pdc tryptophan measurements (17,51).

FIGURE 1

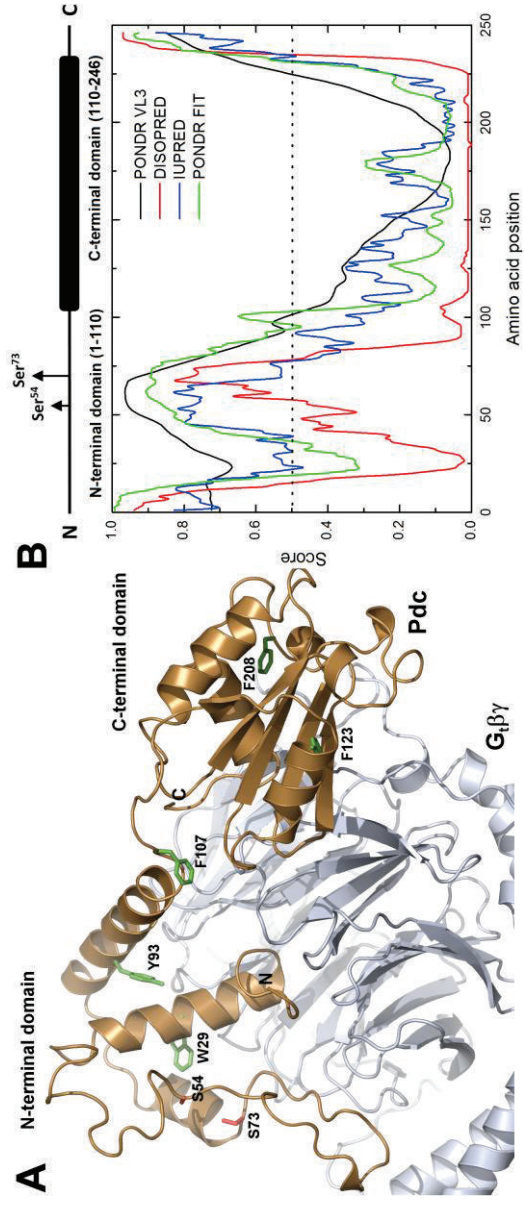


FIGURE 2

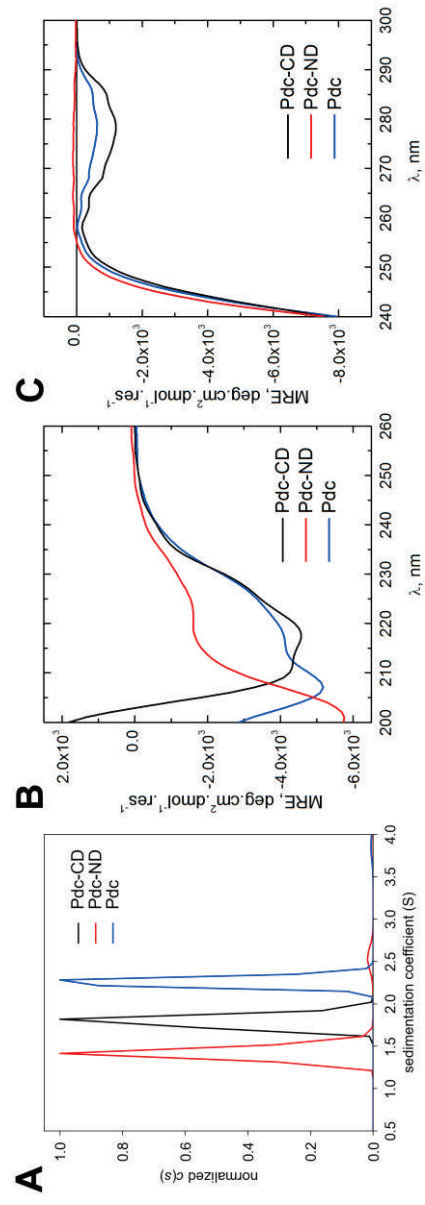


FIGURE 3

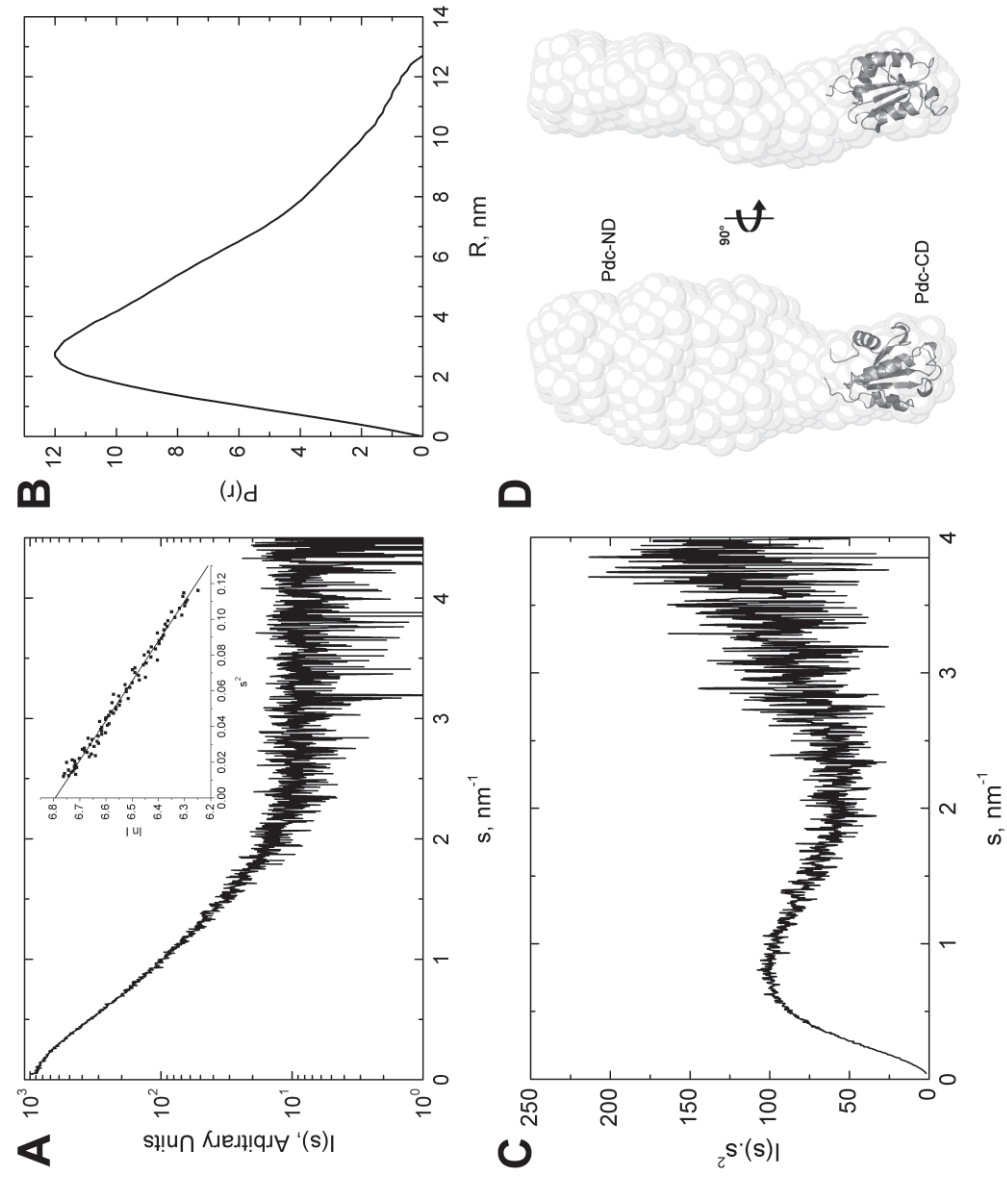


FIGURE 4

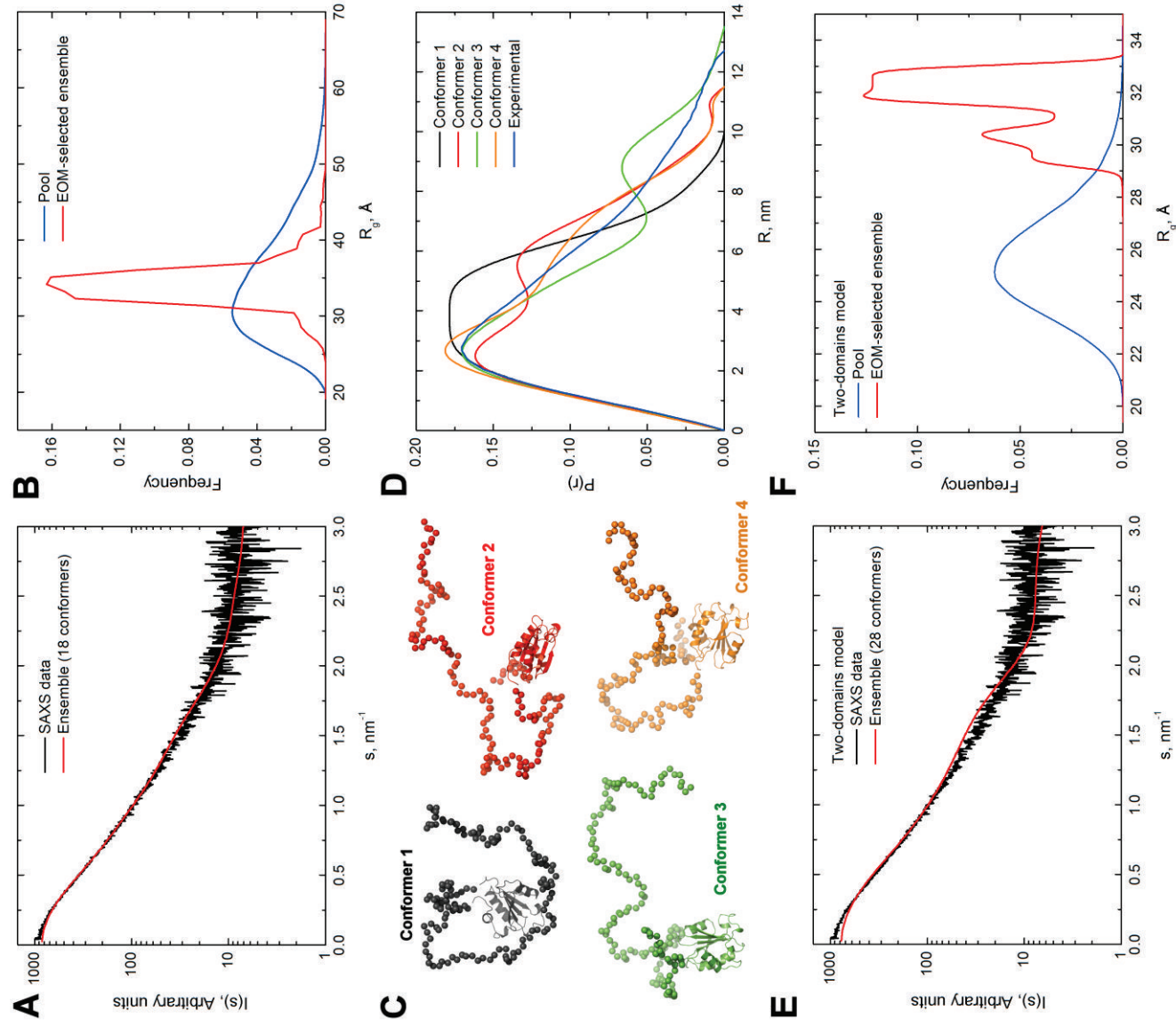


FIGURE 5

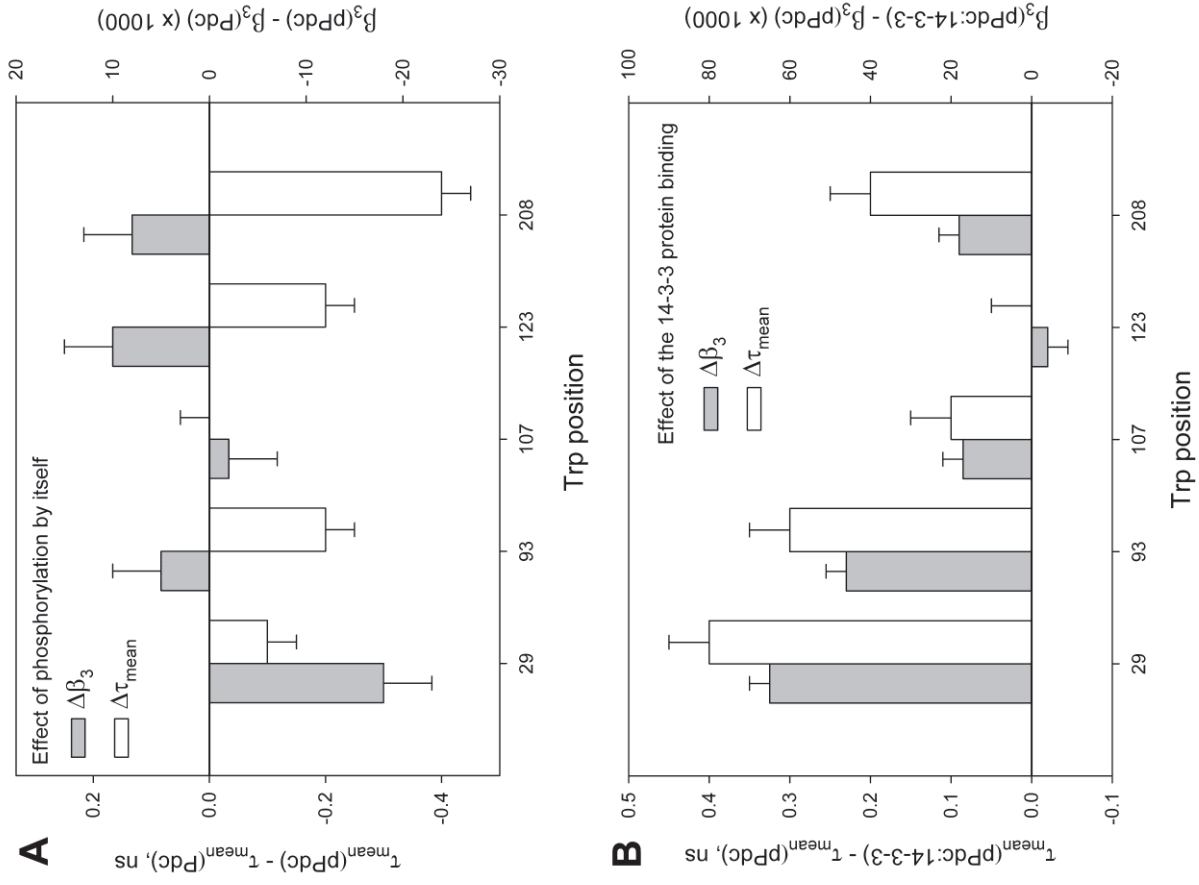


FIGURE 6

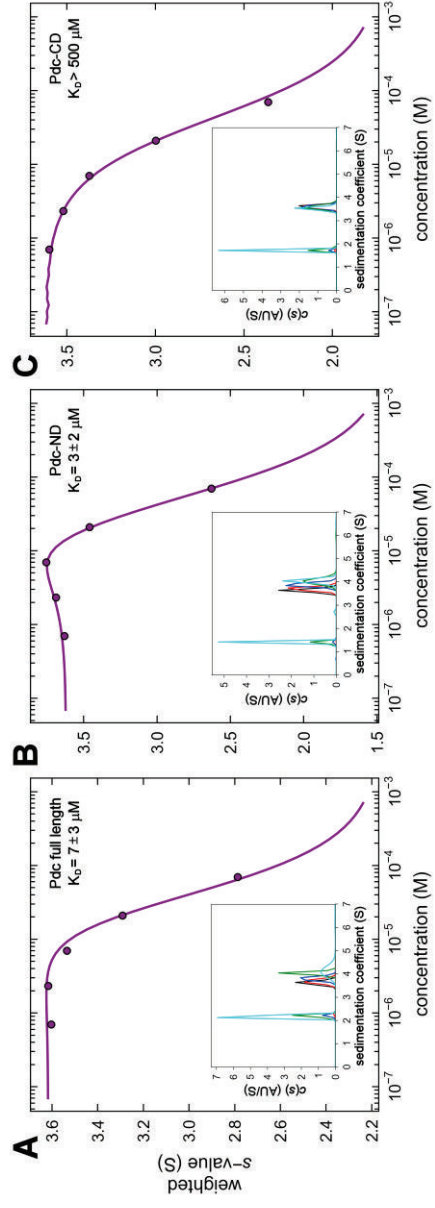


FIGURE 7

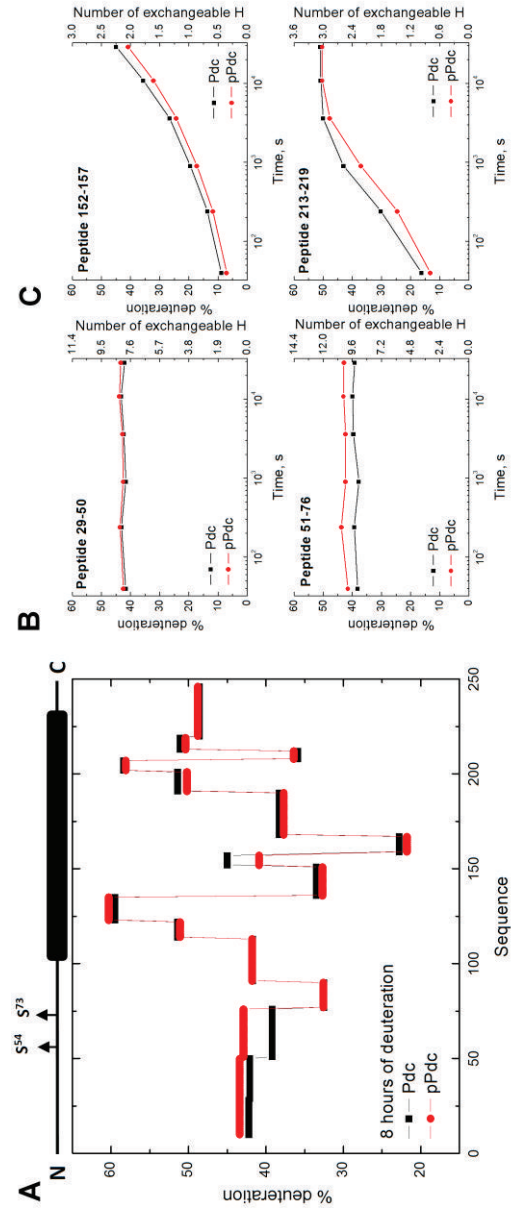


FIGURE 8

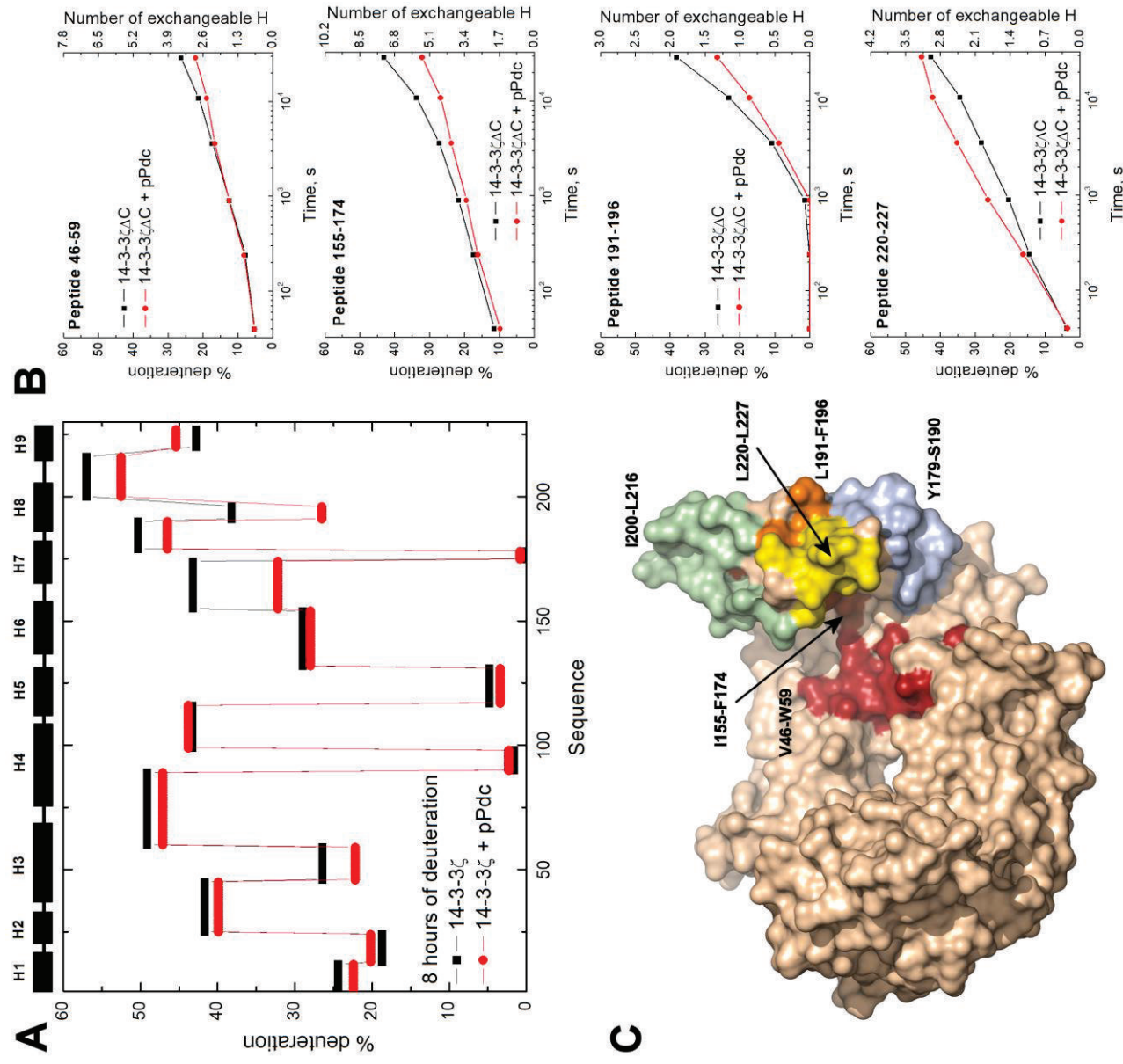
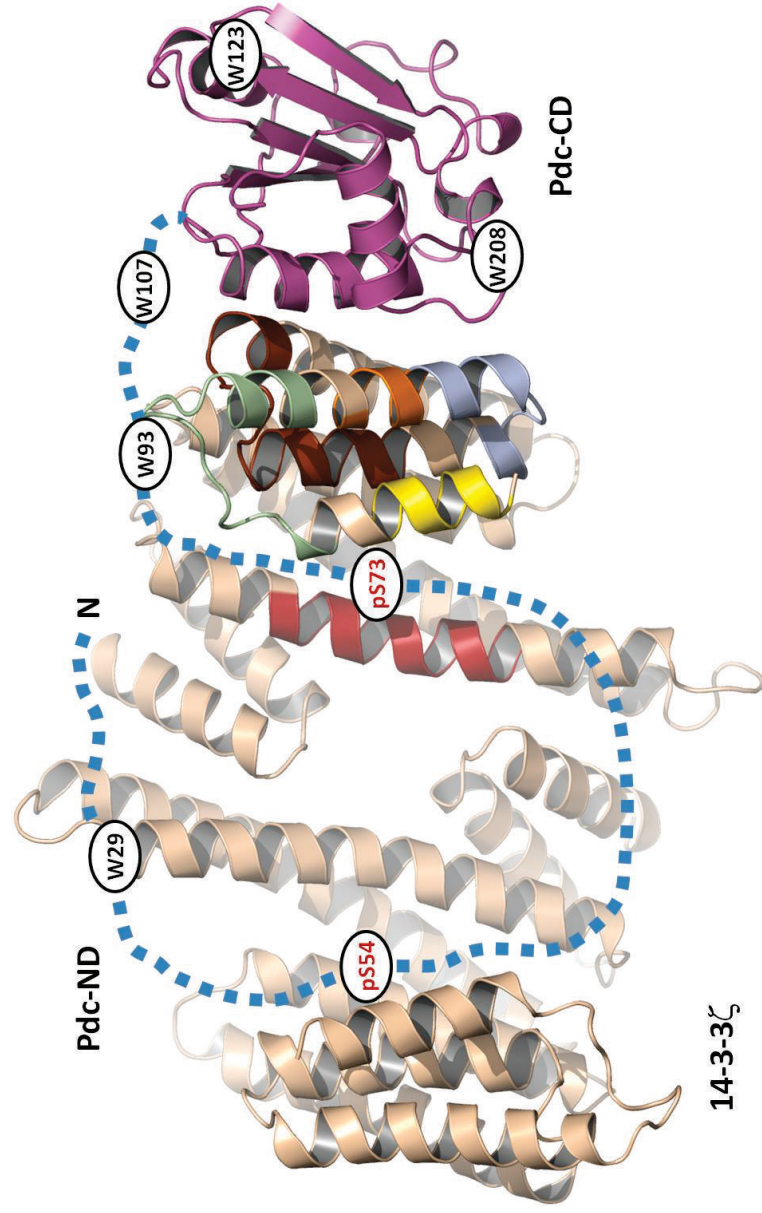


FIGURE 9



Publikace 2

Kosek, D., Kylarova, S., Psenakova, K., Rezabkova, L., Herman, P., Vecer, J., Obsilova, V., Obsil, T.: *Biophysical and structural characterization of the thioredoxin-binding domain of protein kinase ASK1 and its interaction with reduced thioredoxin*, J. Biol. Chem., 289, 24463-74 (2014)

Podíl autora na publikaci:

V rámci této publikace jsem se podílel na vývoji purifikačních protokolů, expresi i purifikaci většiny studovaných proteinů včetně jejich mutantů, úvodní biofyzikální charakterizace, přípravě vzorků na fluorescenční měření. Též jsem provedl všechna měření sedimentačních rychlostí společně s následným zpracováním, analýzou a interpretací sedimentačních dat. Podílel jsem se i na vyhodnocování a interpretaci dat ze SAXS.

Biophysical and Structural Characterization of the Thioredoxin-binding Domain of Protein Kinase ASK1 and Its Interaction with Reduced Thioredoxin^{*}

Received for publication, May 22, 2014, and in revised form, July 15, 2014. Published, JBC Papers in Press, July 17, 2014, DOI 10.1074/jbc.M114.583807

Dalibor Kosek^{‡§1}, Salome Kylarova^{‡§1}, Katarina Psenakova^{‡§}, Lenka Rezabkova[‡], Petr Herman[¶], Jaroslav Vecer[¶], Veronika Obsilova[§], and Tomas Obsil^{‡§2}

From the [‡]Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, 12843 Prague, the [§]Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, 14220 Prague, and the [¶]Institute of Physics, Faculty of Mathematics and Physics, Charles University in Prague, 12116 Prague, Czech Republic

Background: Thioredoxin is a physiological inhibitor of ASK1.

Results: The catalytic motif of thioredoxin is essential for its binding to ASK1 and the interaction does not involve intermolecular disulfide bonds.

Conclusion: Thioredoxin-binding domain of ASK1 is a rigid domain that interacts with reduced thioredoxin through a large binding interface.

Significance: Structural basis of the interaction between ASK1 and reduced thioredoxin.

Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1), a mitogen-activated protein kinase kinase kinase, plays a key role in the pathogenesis of multiple diseases. Its activity is regulated by thioredoxin (TRX1) but the precise mechanism of this regulation is unclear due to the lack of structural data. Here, we performed biophysical and structural characterization of the TRX1-binding domain of ASK1 (ASK1-TBD) and its complex with reduced TRX1. ASK1-TBD is a monomeric and rigid domain that forms a stable complex with reduced TRX1 with 1:1 molar stoichiometry. The binding interaction does not involve the formation of intermolecular disulfide bonds. Residues from the catalytic WCGPC motif of TRX1 are essential for complex stability with Trp³¹ being directly involved in the binding interaction as suggested by time-resolved fluorescence. Small-angle x-ray scattering data reveal a compact and slightly asymmetric shape of ASK1-TBD and suggest reduced TRX1 interacts with this domain through the large binding interface without inducing any dramatic conformational change.

Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)³ (MAP3K5), a member of the mitogen-activated protein kinase kinase family, activates c-Jun N-terminal kinase and p38 MAP kinase signaling pathways in response to various stress stimuli, including oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and calcium ion influx (1–3). ASK1 plays a key role in the pathogenesis of

multiple diseases including cancer, neurodegeneration, and cardiovascular diseases and is considered a promising therapeutic target (reviewed by Ref. 4). Human ASK1 consists of 1,374 amino acids with the serine/threonine kinase domain located in the middle of the molecule flanked by two coiled-coil (CC) motifs, which are important for homo-oligomerization of ASK1 (5, 6). ASK1 under non-stress conditions forms a homo-oligomer by direct interaction through the C-terminal CC domain and interacts with several other proteins including thioredoxin-1 (TRX1) and the 14-3-3 protein, thus forming a high molecular mass complex called ASK1 signalosome (1, 7, 8). Both TRX1 and the 14-3-3 protein are physiological inhibitors of ASK1. In response to oxidative stress they dissociate from ASK1, this allows the homo-oligomerization and recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factors 2 and 6 to the N-terminal region of ASK1 and accelerates the autophosphorylation of Thr⁸³⁸ within the activation loop resulting in ASK1 activation (1, 9, 10).

Thioredoxins (TRXs) are small dithiol oxidoreductases ubiquitously present in species ranging from archaea to mammals. TRXs perform various biological functions including the reduction of protein disulfide bonds in the reducing cellular compartments, the supply of reducing equivalents to redox enzymes, and the regulation of several transcription factors and proteins through either a direct reduction of their cysteine groups or different mechanisms (reviewed by Ref. 11). TRXs are involved in the regulation of NF- κ B (12), the *Escherichia coli* T7 polymerase complex (13), or Jab-1 (14). The TRX molecule consists of a five-stranded β -pleated sheet that forms a hydrophobic core surrounded by four α -helices. The highly conserved redox catalytic motif ³¹WCGPC³⁵ links the second β -strand to the second α -helix and the two cysteine residues within this sequence (Cys³² and Cys³⁵ in human TRX1) are responsible for TRX-dependent redox activity (15).

TRX1 interacts with the ASK1 region located between residues 46 and 277 and this interaction is thought to inhibit the

^{*} This work was supported by Czech Science Foundation Project 14-10061S, Grant Agency of Charles University Project 568912, and Academy of Sciences of the Czech Republic Research Project RVO:67985823 of the Institute of Physiology.

¹ Both authors contributed equally.

² To whom correspondence should be addressed: Faculty of Science, Charles University, Hlavova 8, 12843 Prague, Czech Republic. Tel.: 420-221951303; Fax: 420-224919752; E-mail: obsil@natur.cuni.cz.

³ The abbreviations used are: ASK1, apoptosis signal-regulating kinase 1; ASK1-TBD, TRX1-binding domain of ASK1; AUC, analytical ultracentrifugation; CC, coiled-coil; SAXS, small angle x-ray scattering; SV, sedimentation velocity; TRX1, thioredoxin 1.

Low-resolution Structure of the ASK1·TRX1 Complex

activation of ASK1 through blocking its homo-oligomerization via an adjacent N-terminal CC motif (1, 9). The Cys²⁵⁰ residue, located within this region of ASK1, is crucial for the oxidative stress-dependent signaling downstream of ASK1 and likely involved in TRX1 binding (16, 17). However, the precise mechanism of TRX1 binding to ASK1, as well as its dissociation, is still unclear due to the lack of structural data on the TRX-binding domain of ASK1 (ASK1-TBD). Several studies suggested that under oxidative stress conditions TRX1 is oxidized on Cys³² and Cys³⁵ within the redox catalytic motif and the formation of an intramolecular disulfide bond between these two cysteine residues causes the dissociation of TRX1 from ASK1 through an unknown mechanism, thus allowing the activation of ASK1 (1, 9, 18). It is, however, unclear whether the interaction between TRX1 and ASK1 is based on the non-covalent interactions only or if it also involves the formation of intermolecular disulfide bond(s). The latter possibility was suggested by Nadeau *et al.* (17, 19) who proposed another mechanism for ASK1 activation. The authors suggest the oxidative stress induces the formation of intermolecular disulfide bonds between ASK1 molecules and this oxidation is required for the activation of ASK1 kinase function. In their model, the interaction between TRX1 and ASK1 involves a formation of intermolecular disulfide bond(s) and the TRX1-dependent inhibition of ASK1 is mediated by its thiol reductase activity because only the oxidized and disulfide bond-containing oligomeric form of ASK1 enables activation.

To better understand the interaction between TRX1 and ASK1, we prepared and performed detailed biophysical and structural characterization of the isolated ASK1-TBD (sequence 88–302) and its complex with reduced TRX1. The results show that ASK1-TBD is a monomeric and rigid domain that forms a stable complex with reduced TRX1 with 1:1 molar stoichiometry. The binding interaction does not involve the formation of intermolecular disulfide bonds. Residues Cys³² and Cys³⁵ as well as Trp³¹ from the catalytic WCGPC motif of TRX1 are essential for complex stability with Trp³¹ being directly involved in binding interaction as suggested by time-resolved tryptophan fluorescence. SAXS data revealed a compact and slightly asymmetric shape of ASK1-TBD and suggest reduced TRX1 interacts with this domain through the large binding interface without inducing any dramatic conformational change. Molecular modeling indicated the TRX1 binding site is located close to the N-terminal end of a ~50 residue long α -helix, which forms the C terminus of ASK1-TBD. Our results also show the ASK1 residue Cys²⁵⁰ is likely located either at or in close vicinity of TRX1-binding surface.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Expression and Purification of TRX-binding Domain of ASK1—DNA encoding four different N-terminal fragments of human ASK1 (residues 46–302, 88–302, 46–322, and 88–322) were ligated into pST39 (20) using the XbaI and BamHI sites and pRSFDuet-1 (Novagen) using BamHI and PstI sites. Modified pRSFDuet-1 containing the sequence of the His₆-tagged GB1 domain of protein G inserted into the first multiple cloning site was a gift of Evzen Boura (Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR, Prague, Czech Republic). ASK1-

(88–302) (in pST39) was expressed as a C-terminal His₆ tag fusion protein by leakage expression at 30 °C for 20 h and purified from *E. coli* BL21 (DE3) cells using chelating Sepharose Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences) according to standard protocols. Eluted ASK1-TBD was dialyzed against buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 10% (w/v) glycerol and purified using size-exclusion chromatography on a HiLoad 26/60 Superdex 75 column (GE Healthcare Life Sciences). All mutants were generated by using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) and mutations were confirmed by sequencing.

Expression and Purification of TRX1—The expression construct for human TRX1 (C73S mutant) was a gift of Katja Becker (Justus-Liebig-Universität, Giessen, Germany). TRX1 was expressed as an N-terminal His₆ tag fusion protein by isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside induction for 20 h at 30 °C and purified from *E. coli* BL21 (DE3) cells using chelating Sepharose Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences) according to standard protocols. Eluted TRX1 was dialyzed against buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 10% (w/v) glycerol and purified using size-exclusion chromatography on Superdex 75 10/300 GL column (GE Healthcare Life Sciences). All mutants were generated by using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene), and mutations were confirmed by sequencing.

Preparation of Oxidized TRX1—TRX1 (140 μ M in buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 200 mM NaCl) was incubated with 100-fold molar excess of H₂O₂ in a total volume of 500 μ l for 15 min at 37 °C (21). Oxidation reaction was stopped by adding 2 units of catalase (Sigma).

Time-resolved Fluorescence Measurements—Fluorescence intensity and anisotropy decays were measured on a time-correlated single photon counting apparatus, as described previously (22). Tryptophan emission was excited at 298 nm by a tripled output of the Ti:Sapphire laser. Tryptophan fluorescence was isolated at 355 nm by a combination of monochromator and a stack of UG1 and BG40 glass filters (Thorlabs) placed in front of the input slit. Fluorescence decays were typically accumulated in 1024 channels with a time resolution of 50 ps/channel until 10⁵ counts in the decay maximum were reached. Samples were placed in a thermostatic holder, and all experiments were performed at 23 °C in a buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, and 5 mM DTT. The TRX1 concentration was 10 μ M; the ASK1-TBD concentration was 30 μ M (or 10 μ M in experiments with Trp-containing mutants of ASK1-TBD). Fluorescence decays were assumed to be multiexponential according to the formula,

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \cdot \exp(-t/\tau_i) \quad (\text{Eq. 1})$$

where τ_i and α_i are the fluorescence lifetime components and the corresponding amplitudes, respectively. Emission decays $I(t)$ were analyzed by a maximum entropy method (23). The program yields a set of amplitudes, α_i , representing the lifetime distribution. Typically, we have chosen 100 lifetimes equidistantly spaced in a logarithmic scale, ranging from 20 ps to 20 ns. The mean emission lifetime was calculated as,

$$\tau_{\text{mean}} = \sum_i f_i \tau_i = \frac{\sum_i (\alpha_i \tau_i^2)}{\sum_i (\alpha_i \tau_i)} \quad (\text{Eq. 2})$$

where f_i are the fractional intensities of corresponding lifetime components. Fluorescence anisotropy $r(t)$ was obtained by a simultaneous reconvolution of parallel $I_{\parallel}(t)$ and perpendicular $I_{\perp}(t)$ polarized components. The anisotropies $r(t)$ were analyzed for a series of exponentials by a model-independent maximum entropy method without setting assumptions about the shape of the correlation time distributions (23),

$$r(t) = \sum_i \beta_i \cdot \exp(-t/\phi_i) \quad (\text{Eq. 3})$$

where amplitudes β_i represent the distribution of the correlation times ϕ_i . They are related to the initial anisotropy r_0 by the following formula.

$$\sum_i \beta_i = r_0 \quad (\text{Eq. 4})$$

Typically we used 100 correlation times equidistantly spaced in the logarithmic scale from 100 ps to 200 ns.

Analytical Ultracentrifugation (AUC)—Sedimentation velocity (SV) experiments were performed using a ProteomLabTM XL-I analytical ultracentrifuge (Beckman Coulter). Samples were dialyzed against buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, and 2 mM 2-mercaptoethanol before analysis. Experiments with oxidized TRX1 were performed in buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), and 200 mM NaCl. The buffer density, viscosity, and partial specific volume of all proteins were estimated using the program SEDNTERP. SV experiments of ASK1-TBD and TRX1 were conducted at various loading concentrations and molar ratios in charcoal-filled Epon centerpieces with 12-mm optical path length, 20 °C, and 48,000 rpm rotor speed (An-50 Ti rotor, Beckman Coulter). All sedimentation profiles were recorded with interference optics. The diffusion-deconvoluted sedimentation coefficient distributions $c(s)$ were calculated from raw interference data using the software package SEDFIT. For experiments with mixtures of TRX1 and ASK1-TBD at various molar ratios, this procedure was followed by the integration of calculated distributions to determine the overall weight-averaged s -values (s_w). Constructed s_w isotherms were fitted with $A + B \rightleftharpoons AB$ model as implemented in the software package SEDPHAT with known s_w values of individual components as prior knowledge. Resulting parameters were verified and loading concentrations were corrected using global Lamm equation modeling also implemented in SEDPHAT software (24, 25).

Small Angle X-ray Scattering—SAXS data were collected on the European Molecular Biology Laboratory (EMBL) P12 beamline on the storage ring PETRA III (Deutsches Elektronen Synchrotron (DESY), Hamburg, Germany). The ASK1-TBD, TRX1, and ASK1-TBD·TRX1 complex were measured in concentration ranges of 1.2–4.6, 1.4–12, and 1.5–11.9 mg ml⁻¹, respectively. The data were averaged after normalization to the intensity of the transmitted beam, and the scattering of buffer was subtracted using PRIMUS (26). The forward scattering $I(0)$ and the radius of gyration R_g were evaluated using the Guinier

approximation (27). These parameters were also computed from the entire scattering pattern using the program GNOM (28), which provides the distance distribution functions $P(r)$ and the maximum particle dimensions D_{max} . The solute apparent molecular mass (MM_{exp}) was estimated by comparison of the forward scattering with that from reference solutions of bovine serum albumin (molecular mass 66 kDa). *Ab initio* molecular envelopes were computed by the program DAMMIN (29), which represents the protein by an assembly of densely packed beads. Multiple iterations of DAMMIN were averaged using the program DAMAVER (30). The averaged envelopes were then used as final SAXS structures.

Circular Dichroism Measurements—The far-UV CD spectra were measured in a quartz cuvette with an optical path length of 1 mm (Starna, USA) using a J-810 spectropolarimeter (Jasco, Japan). The conditions of the measurements were as follows: a spectral region of 200–260 nm, a scanning speed of 10 nm min⁻¹, a response time of 8 s, a resolution of 1 nm, a bandwidth of 1 nm, and a sensitivity of 100 mdeg. The final spectrum was obtained as an average of 5 accumulations. The spectra were corrected for a baseline by subtracting the spectra of the corresponding polypeptide-free solution. The CD measurements were conducted at 22 °C in buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, and 2 mM 2-mercaptoethanol. The ASK1-TBD and TRX1 concentrations were 8 μM. After baseline correction, the final spectra were expressed as a mean residue ellipticities Q_{MRW} (deg cm² dmol⁻¹ res⁻¹) and calculated using the equation,

$$[Q]_{\text{MRW}} = \frac{\theta_{\text{obs}} M_w}{c l N_R 10} \quad (\text{Eq. 5})$$

where θ_{obs} is the observed ellipticity in mdeg, c is the protein concentration in mg ml⁻¹, l is the path length in cm, M_w is the protein molecular weight, and N_R is the number of amino acids in the protein (31). The near-UV CD spectra were measured in a quartz cuvette with an optical path length of 1 cm (Starna, USA) in a spectral region of 250–320 nm. The final spectrum was obtained as an average of 15 accumulations. The ASK1-TBD and TRX1 concentrations were 26 μM.

Protein Structure Modeling—Because ASK1 sequence 88–302 does not show any homology to known structures, its structural models were created by *ab initio* modeling using I-TASSER (32), Phyre2 (33), and Robetta (34) servers. The agreement between the calculated scattering curves of theoretical models and the experimental SAXS data were evaluated using CRY SOL (35).

RESULTS

Preparation of ASK1-TBD and Its Complex with TRX1—It has previously been shown ASK1-TBD is located between residues 46 and 277 within the N-terminal part of ASK1 (1, 9). We expressed several constructs of human ASK1 consisting of residues 46–302, 88–302, 46–322, and 88–322 with either the C-terminal His₆ tag or the N-terminal His₆-GB1 tag and tested their solubility and stability. Only the construct consisting of the C terminally His-tagged ASK1 sequence 88–302 exhibited sufficient expression yield, solubility, and stability, and thus was used for further studies. To avoid TRX1 homo-dimerization

Low-resolution Structure of the ASK1-TRX1 Complex

due to the intermolecular disulfide bond formation by the non-active site Cys⁷³ residue under high protein concentrations, we decided to use the mutant C73S of human TRX1 (denoted in this work as TRX1), rather than the wild-type protein, throughout this work. This mutation has no effect on the activity or the structure of human TRX1 (36, 37).

Biophysical Characterization of the Interaction between ASK1-TBD and Reduced TRX1—The AUC was used for the biophysical characterization of prepared ASK1-TBD and its interaction

with TRX1 under reducing conditions. The normalized continuous sedimentation coefficient distributions $c(s)$ from the SV AUC experiments revealed the reduced TRX1 and ASK1-TBD form a complex with a weight-averaged sedimentation coefficient (corrected to 20.0 °C and the density of water), $s_{w(20,w)}$, of 3.0 S, whereas TRX1 and ASK1-TBD alone show single peaks with $s_{w(20,w)}$ values of 1.6 and 2.4 S, respectively (Fig. 1). The observed values of $s_{w(20,w)}$ for TRX1 and ASK1-TBD correspond to molecular masses of ~12 and ~25 kDa, respectively, suggesting both proteins are monomers in solution (theoretical molecular mass of TRX1 and ASK1-TBD are 12.99 and 25.57 kDa, respectively). In addition, the observed value of $s_{w(20,w)}$ of 3.0 S for the ASK1-TBD-TRX1 complex corresponds to molecular mass of ~33 kDa, suggesting the 1:1 molar stoichiometry of the complex (theoretical molecular mass = 38.6 kDa). To obtain the apparent equilibrium dissociation constant (K_D) of the ASK1-TBD-TRX1 complex, a range of concentrations and different molar ratios of ASK1-TBD and reduced TRX1 were examined using SV AUC (Fig. 2A). Analysis of the isotherm of weight-averaged s values (s_w isotherm) as a function of TRX1 concentration revealed the best-fit K_D of $0.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$ using a 1:1 Langmuir binding model. This confirms the ASK1-TBD and TRX1 form a complex with a 1:1 molar stoichiometry. Because all SV AUC experiments were performed in the presence of the reducing agent 2-mercaptoethanol and obtained SV AUC data can be adequately fitted using the reversible Langmuir-type kinetic model ($A + B \rightleftharpoons AB$), it is reasonable to assume the interaction between ASK1-TBD and TRX1 under

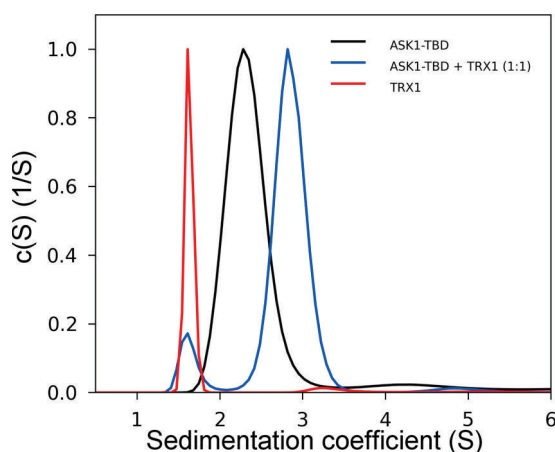


FIGURE 1. **Sedimentation velocity ultracentrifugation.** The normalized continuous sedimentation coefficient distributions, $c(s)$, for ASK1-TBD alone (black), TRX1 alone (red), and ASK1-TBD and TRX1 mixed in the molar ratio 1:1 (blue) are shown. All experiments were performed under reducing conditions.

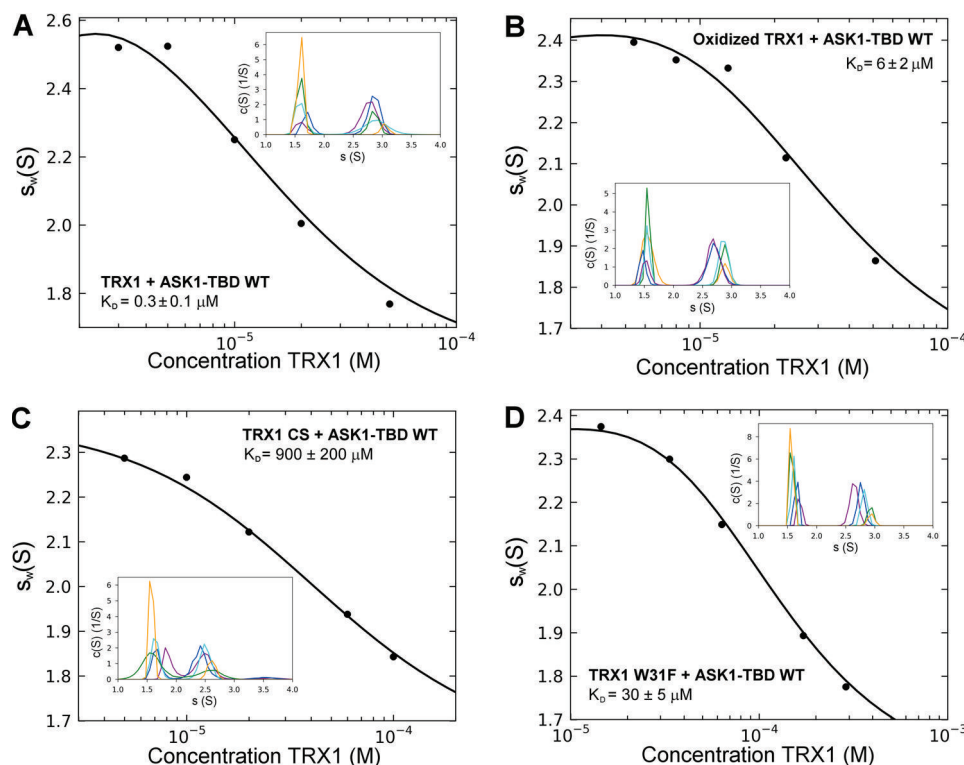


FIGURE 2. **Sedimentation velocity ultracentrifugation.** A, isotherm of weight-averaged sedimentation coefficients (s_w isotherm) obtained from SV experiments of mixtures of ASK1-TBD WT ($5 \mu\text{M}$) and reduced TRX1 ($3\text{--}50 \mu\text{M}$). B, the s_w isotherm obtained from SV experiments of mixtures of ASK1-TBD WT ($5 \mu\text{M}$) and oxidized TRX1 ($3\text{--}50 \mu\text{M}$). TRX1 was oxidized by incubation with a 100-fold molar excess of H_2O_2 for 15 min at 37°C (21). C, the s_w isotherm obtained from SV experiments of mixtures of ASK1-TBD WT ($20 \mu\text{M}$) and reduced TRX1 CS mutant ($5\text{--}100 \mu\text{M}$). D, the s_w isotherm obtained from SV experiments of mixtures of ASK1-TBD W31F mutant ($20 \mu\text{M}$) and reduced TRX1 ($15\text{--}290 \mu\text{M}$). The insets show the sedimentation coefficient distributions $c(s)$ of mixtures of ASK1-TBD and TRX1 at various concentrations and molar ratios underlying the s_w data points.

reducing conditions does not involve the formation of intermolecular disulfide bonds. No significant amount of the mixed disulfide ASK1-TBD·TRX1 complex was observed even upon the 36-h long incubation of an equimolar mixture of ASK1-TBD and TRX1 in the absence of the reducing agents (Fig. 3), further corroborating that intermolecular disulfide bonds are not involved in complex formation.

Oxidized TRX1 Binds ASK1-TBD with Significantly Lower Binding Affinity Compared with Reduced TRX1—Several studies have shown the oxidation of TRX1 disrupts its binding to ASK1 (1, 9, 18). Therefore, we next examined the interaction between oxidized TRX1 and ASK1-TBD using SV AUC. Oxidized TRX1 was prepared by incubation with 100-fold molar excess of H_2O_2 for 15 min at 37 °C. Such oxidation was previously shown to produce well defined TRX1 containing two-disulfide bridges (Cys³²-Cys³⁵, Cys⁶²-Cys⁶⁹) (21). The s_w isotherm was determined over a range of loading concentrations of oxidized TRX1 and ASK1-TBD (Fig. 2B). The analysis of

obtained data revealed oxidized TRX1 exhibits a significantly lower binding affinity for ASK1-TBD compared with reduced TRX1 with the best-fit K_D of $6 \pm 2 \mu M$ using a 1:1 Langmuir binding model, confirming the oxidation of TRX1 disrupts its interaction with ASK1.

Structural Integrity of the Catalytic WCGPC Motif of TRX1 Is Essential for the Binding to ASK1-TBD—The redox-inactive mutant TRX1-CS where both Cys residues (Cys³² and Cys³⁵) from the catalytic ³¹WCGPC³⁵ motif were replaced by Ser does not bind to ASK1 (1, 9, 18). To test whether this is also true for the interaction with the isolated ASK1-TBD, SV AUC experiments were conducted and the s_w isotherm was determined over a range of loading concentrations of TRX1-CS and ASK1-TBD (Fig. 2C). These data revealed negligible binding affinity (K_D was estimated to be of $\sim 900 \pm 200 \mu M$) for the TRX1-CS mutant, in agreement with previous reports. In addition, the catalytic ³¹WCGPC³⁵ motif of human TRX1 contains a conserved Trp³¹, which is located in close proximity to the catalytic Cys residues and undergoes a conformational change upon oxidation of Cys³² and Cys³⁵ or their mutation to Ser (37, 38). Both oxidized TRX1 and the TRX1-CS mutant exhibit significantly reduced binding to ASK1 (1, 9, 18), suggesting possible involvement of Trp³¹ in this interaction. To check the importance of this residue, TRX1 mutant W31F was prepared and its binding to ASK1-TBD was investigated using SV AUC (Fig. 2D). Indeed, the obtained SV data revealed significantly lower binding affinity of the W31F mutant to ASK1-TBD (K_D of $30 \pm 5 \mu M$), confirming the importance of this residue for ASK1-TBD·TRX1 complex stability.

Trp³¹ of TRX1 Is Directly Involved in the Interaction with ASK1-TBD—Because Trp³¹ is the only tryptophan residue in human TRX1 and ASK1-TBD does not contain any tryptophan residue, the time-resolved tryptophan fluorescence intensity and anisotropy decay measurements were used to further study the involvement of Trp³¹ in TRX1 binding to ASK1-TBD. Both time-resolved fluorescence intensity and anisotropy decays were analyzed using a singular-value decomposition maximum entropy method as previously described (23). Complex formation significantly increased the mean excited state lifetime (τ_{mean}) of Trp³¹ from 1.62 to 3.34 ns (Table 1). This could reflect the ASK1-induced conformational change in TRX1, which affects interaction of Trp³¹ with its surroundings. The observed increase in τ_{mean} could also reflect a direct interaction of ASK1-TBD with this residue, reducing its contacts with the polar environment or altering quenching interactions in its vicinity.

Measurements of the emission anisotropies revealed significantly different mobility of TRX1 Trp³¹ in the presence and

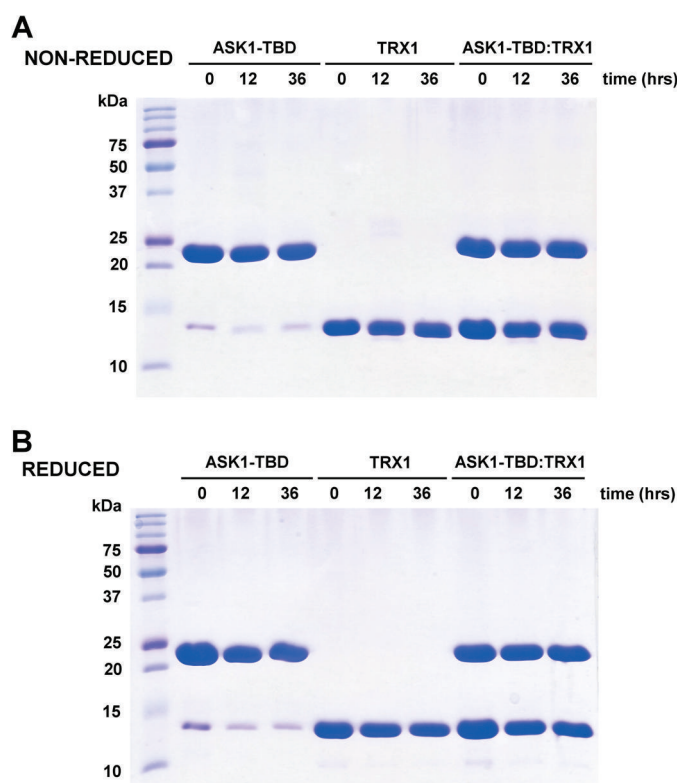


FIGURE 3. Non-reduced (A) and reduced (B) 15% SDS-PAGE of purified ASK1-TBD, TRX1, and their mixture (with 1:1 molar ratio) after the incubation in a buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, and 1 mM EDTA (and no reducing agents) for 0, 12, and 36 h at 4 °C.

TABLE 1
Summary of time-resolved fluorescence measurements of Trp³¹ of TRX1

Sample	$\tau_{mean}^{a,b}$	$\beta_1^{c,d}$	$\phi_1^{c,e}$	$\beta_2^{c,d}$	$\phi_2^{c,e}$	$\beta_3^{c,d}$	$\phi_3^{c,e}$	$\beta_{long}^{c,d}$	$\phi_{long}^{c,e}$
TRX1 alone	ns	0.018	ns	0.069	ns	ns	ns	0.133	ns
TRX1 + ASK1-TBD WT	3.34		<0.1	0.069	1.7	0.079	3.3	0.141	30
TRX1 + ASK1-TBD C250S	4.52	0.026	<0.1	0.024	1.3	0.034	3.8	0.136	38

^a The mean fluorescence lifetime (τ_{mean}) was calculated using Equation 2.

^b S.D. = 0.05 ns.

^c The fluorescence anisotropies $r(t)$ were analyzed for series of exponentials (Equation 3), where the amplitudes β_i represent the distribution of the correlation times ϕ_i . Initial anisotropy of Trp³¹ for all samples is $r_0 = 0.22 \pm 0.01$. Amplitudes β_1 were calculated as $\beta_1 = r_0 - (\beta_2 + \beta_3 + \beta_{long})$ for each sample.

^d S.D. = 0.005.

^e S.D. = 15%.

Low-resolution Structure of the ASK1-TRX1 Complex

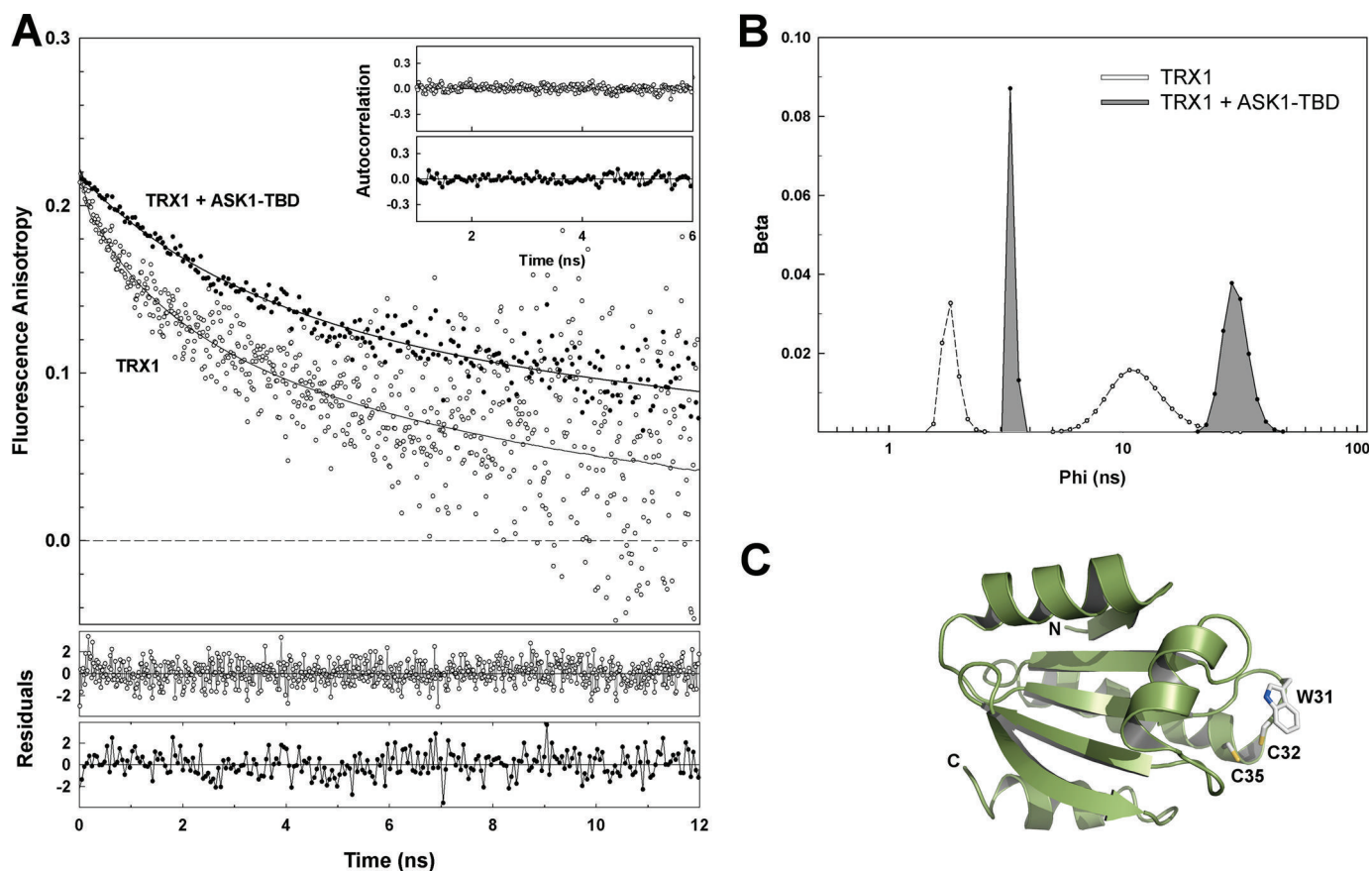


FIGURE 4. Time-resolved TRX1 Trp³¹ fluorescence anisotropy decay measurements. *A*, TRX1 Trp³¹ fluorescence anisotropy decays constructed from the raw polarized decay data for TRX1 in the absence (○) and presence (●) of ASK1-TBD. The weighted residuals of both fits (gray, TRX1 alone; black, TRX1 + ASK1-TBD) are shown in the lower panels. The fit quality is also demonstrated by the autocorrelation functions shown in the inset (gray, TRX1 alone; black, TRX1 + ASK1-TBD). *B*, rotational correlation time distributions of Trp³¹ (TRX1) in the absence and presence of ASK1-TBD. The unresolved component with very short correlation time (ϕ_1 , < 100 ps) observed in the fluorescence anisotropy decay of TRX1 alone is not shown. *C*, solution structure of reduced human TRX1 (38). Residues Trp³¹, Cys³², and Cys³⁵ are shown as sticks.

absence of ASK1-TBD as documented by the raw data presented in Fig. 4A. Visual inspection of early depolarization phases in Fig. 4A clearly reveals fluorescence of Trp³¹ depolarizes significantly faster in the absence than in the presence of ASK1-TBD. The depolarization rate can be directly related to the rotational freedom of the Trp³¹ residue. The slower depolarization means slower and/or more restricted local and segmental motion of the fluorophore (39). From this point of view, the binding of ASK1-TBD reduces segmental flexibility of the catalytic motif where Trp³¹ is located. This observation correlates with the decrease in τ_{mean} (Table 1), which could indicate the motional restriction of the catalytic motif results in lower accessibility of Trp³¹ to polar environment and/or suppressed quenching interactions in its vicinity. Rigorous data analysis is in full agreement with the visual observation. TRX1 alone revealed two classes of short correlation times, one very short unresolved (ϕ_1 < 100 ps) and the second, ϕ_2 , close to 1.7 ns (Table 1, Fig. 4B). In addition, the third correlation time $\phi_{\text{long}} = 10$ ns was also present in the data. The recovered ϕ_{long} can be assigned to the overall rotational motion of TRX1, and its value is close to what would be expected for a globular protein with a molecular mass about 13 kDa (39). Complex formation resulted in a disappearance of the fastest decay component with the correlation time ϕ_1 belonging to the fastest Trp³¹ motion. At

the same time, the correlation time corresponding to the segmental motion increased from 1.7 to 3.3 ns ($\phi_2 \rightarrow \phi_3$, Table 1 and Fig. 4B). Complex formation also slightly decreased the sum of amplitudes of the fast anisotropy decay components β_{short} ($\beta_{\text{short}} = \beta_1 + \beta_2 + \beta_3$) indicating angular restriction of the motion. Altogether, these changes can be interpreted as a significantly reduced segmental flexibility of the catalytic motif, where Trp³¹ is located, upon the TRX1 binding to ASK1-TBD. In addition, the observed increase in the longest correlation time ϕ_{long} from 10 to 30 ns likely reflects the higher molecular mass of the complex compared with TRX1 alone and its value corresponds with the expected molecular mass of the complex (38.6 kDa). These results suggest Trp³¹ from the catalytic motif of TRX1 could be directly involved in its interaction with ASK1-TBD.

ASK1-TBD Is a Rigid Domain That Does Not Change Its Structure Upon the Binding of TRX1—To investigate the structural flexibility of ASK1-TBD, the time-resolved tryptophan fluorescence intensity and anisotropy decay measurements of single tryptophan residues inserted at four different positions within the ASK1-TBD (Trp¹³², Trp¹⁷⁵, Trp²⁴², and Trp²⁷²) were performed. The sequence of ASK1-TBD does not contain any tryptophan residue; phenylalanines located at these positions were replaced by tryptophans. Results of these measure-

ments are listed in Table 2. It can be noticed that all four mutants showed relatively long τ_{mean} ranging from 4.22 to 5.35 ns, indicating that all four Trp residues are likely buried and inaccessible to the polar environment (40). The analysis of fluorescence anisotropy decays revealed bimodal correlation time distributions (Table 2) with small amplitudes of the fast rotational and segmental motion of the fluorophore (β_1), suggesting regions around all four Trp residues, especially Trp inserted at position 242, are rigid. These data suggest that ASK1-TBD is a compact and rigid domain.

Next, CD spectroscopy was used to check whether the binding of TRX1 affects the overall structure of ASK1-TBD. The deconvolution of CD spectra using the K2D method (41) indicated that ASK1-TBD contains $\sim 35\%$ of α , $\sim 20\%$ of β , and $\sim 45\%$ of random structure. This estimation is in agreement with the theoretical prediction using PSIPRED (35% α , 15% β , and 50% random structure) (42). The far-UV CD spectrum of the ASK1-TBD-TRX1 complex (with 1:1 molar stoichiometry) showed no significant difference when compared with the sum of the individual CD spectra of ASK1-TBD and TRX1 (Fig. 5A), suggesting no significant changes in overall secondary structure upon complex formation. The comparison of near-UV CD spectra that give us the information about the tertiary structure

reveal significant differences only in the region from 275 to 295 nm (Fig. 5B). Because the CD signal in this region arises from the environments of Tyr and Trp residues (43), it is likely that the observed differences mainly reflect the structural change in the vicinity of TRX1 Trp³¹ upon complex formation as has also been suggested by time-resolved tryptophan fluorescence experiments (Table 1 and Fig. 4).

Low-resolution Structure of ASK1-TBD and Its Complex with TRX1 Obtained from SAXS Measurements—SAXS was used to obtain the visual insight into the structure of ASK1-TBD and its complex with TRX1. The experimental SAXS curves from the ASK1-TBD-TRX1 complex and ASK1-TBD alone are shown in Fig. 6A. The absence of aggregation in both samples was confirmed by the inspection of the SAXS data and the linearity of the Guinier region (*inset* in Fig. 6A). The apparent molecular masses of ASK1-TBD and the ASK1-TBD-TRX1 complex were estimated by comparison of the forward scattering intensity $I(0)$ with that from reference solutions of bovine serum albumin (Table 3). The estimated mass of 37 kDa for the ASK1-TBD-TRX1 complex corresponds well to a 1:1 stoichiometry (theoretical molecular mass = 38.6 kDa) in agreement with the results from SV AUC. Values of the R_g calculated both from the slope of the Guinier plot and from the distance distribution ($P(r)$) function suggest the complex is more asymmetric compared with ASK1-TBD alone (Table 3). This was further confirmed by the $P(r)$ function, which revealed maximum dimensions (D_{max}) of ASK1-TBD alone and the ASK1-TBD-TRX1 complex to be 82 and 99 Å, respectively (Fig. 6B). These D_{max} values corroborate a more extended and asymmetric shape of the complex compared with ASK1-TBD alone.

To obtain the information about the shape of these molecules, the *ab initio* envelopes were calculated from the scattering data using the program DAMMIN (Fig. 6, C and D). The reconstructed envelopes consist of an average of at least 10 individual reconstructions and the individual envelopes agreed well with each other, as determined using normalized spatial discrepancy. Normalized spatial discrepancy is a measure of the degree each of the selected envelopes differs from one another.

TABLE 2

Summary of time-resolved fluorescence measurements of single tryptophan (W) mutants of ASK1-TBD

ASK1-TBD Trp mutant	$\tau_{\text{mean}}^{a,b}$	$\beta_1^{c,d}$	$\phi_1^{c,e}$	$\beta_2^{c,d}$	$\phi_2^{c,e}$
	<i>ns</i>		<i>ns</i>		<i>ns</i>
W132	4.62	0.033	2.7	0.190	18
W175	5.35	0.038	2.0	0.180	18
W242	4.94	0.020	5.0	0.192	18
W272	4.22	0.032	2.5	0.162	16
			0.013	Aggr. (>50)	

^a The mean fluorescence lifetime (τ_{mean}) was calculated using Equation 2.

^b S.D. = 0.05 ns.

^c The fluorescence anisotropies $r(t)$ were analyzed for series of exponentials (Equation 3), where the amplitudes β_i represent the distribution of the correlation times ϕ_i .

^d S.D. = 0.005.

^e S.D. = 15%.

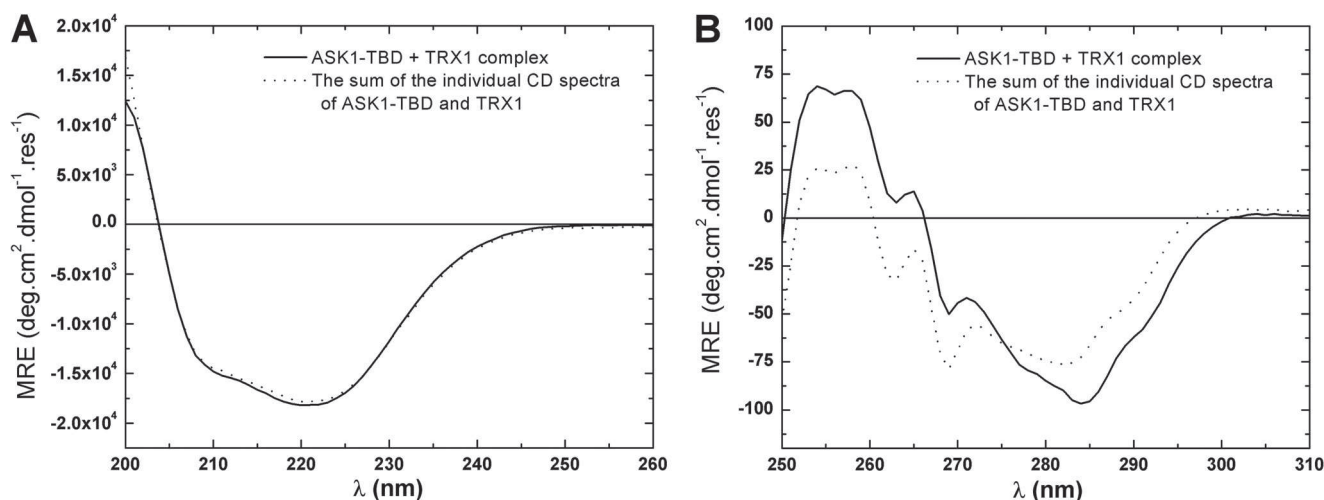


FIGURE 5. **Circular dichroism measurements.** A, the comparison of the far-UV CD spectrum of the ASK1-TBD-TRX1 complex (solid line) with the sum of the individual far-UV CD spectra of ASK1-TBD and TRX1 (dotted line). B, the comparison of the near-UV CD spectrum of the ASK1-TBD-TRX1 complex (solid line) with the sum of the individual near-UV CD spectra of ASK1-TBD and TRX1 (dotted line). Proteins were mixed with the 1:1 molar stoichiometry. The mean residue ellipticity (MRE) is plotted as a function of the wavelength.

Low-resolution Structure of the ASK1·TRX1 Complex

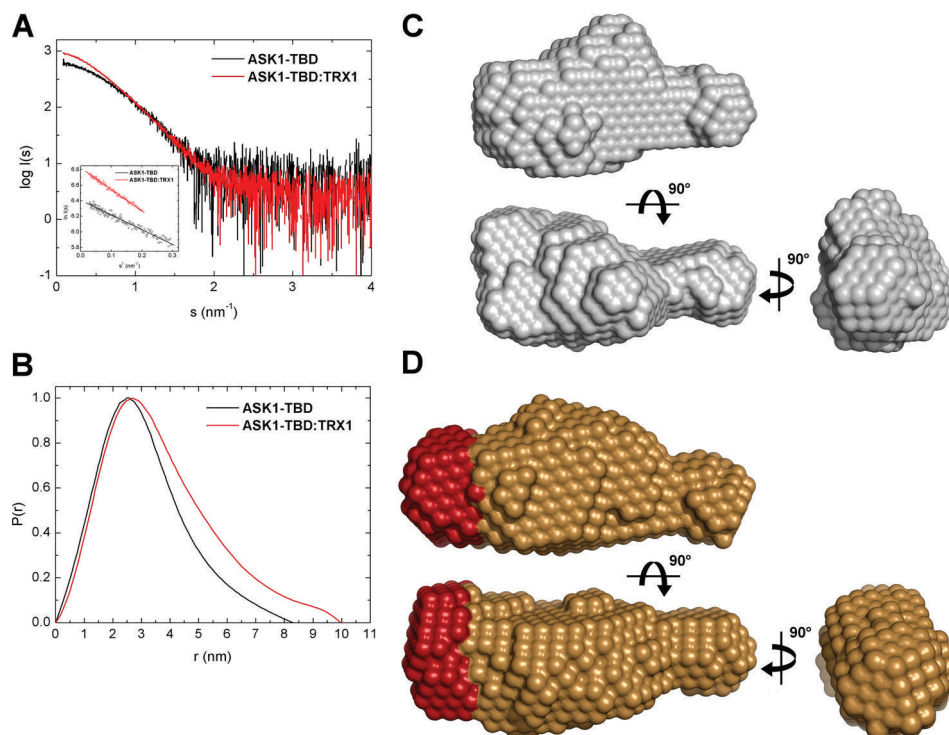


FIGURE 6. **Structural characterization of ASK1-TBD and its complex with reduced TRX1 by SAXS.** *A*, scattering intensity as a function of the scattering vector s ($s = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$, where 2θ is the scattering angle and λ is the wavelength). *Inset* shows Guinier plots of ASK1-TBD and the ASK1-TBD·TRX1 complex at concentrations 2.3 and 6 mg/ml, respectively. *B*, distance distribution function $P(r)$. *C*, averaged and filtered DAMMIN shape envelope (spheres around the dummy residues) of ASK1-TBD. *D*, averaged and filtered DAMMIN shape envelope of the ASK1-TBD·TRX1 complex. The main difference between the envelope of the complex and those of ASK1-TBD alone is shown in red.

TABLE 3
Structural parameters determined from SAXS data

Sample	R_g^a	R_g^b	$M_{w,I(0)}^c$	D_{max}^d
	Å		kDa	Å
ASK1-TBD	23.7 ± 0.3	24.2 ± 0.2	~ 25	82
ASK1-TBD·TRX1	28.9 ± 0.2	29.3 ± 0.1	~ 37	99

^a Determined by Guinier approximation.

^b Determined from $P(r)$ function.

^c Estimated by comparison of the forward scattering intensity $I(0)$ with that from reference solutions of bovine serum albumin.

^d Determined by indirect Fourier transformation from SAXS data.

Values <1 are considered to indicate no systematic differences. Normalized spatial discrepancy values of 0.58 and 0.49 were obtained for envelopes of ASK1-TBD and the ASK1-TBD·TRX1 complex, respectively. The envelope for ASK1-TBD alone (Fig. 6C) shows this domain adopts a compact and slightly asymmetric conformation with one side being narrower than the other. The envelope of the complex (Fig. 6D) is similar and shows a more extended thicker part of the molecule, suggesting that TRX1 interacts with this thicker end of the ASK1-TBD molecule. The size ($\sim 20 \times \sim 35 \times \sim 30$ Å) and the shape of this additional area (shown in red in Fig. 6D) correspond well with the size and the shape of the TRX1 molecule. The comparison of both envelopes also suggests the interaction between TRX1 and ASK1-TBD is mediated through the large binding interface, rather than one or few contacts. In good agreement with results of CD measurements, the high similarity of obtained envelopes also indicates that TRX1 binding does not induce any dramatic structural change within ASK1-TBD, although we cannot rule out the possibility of a local conformational change that is beyond the resolution of this method.

Structural Modeling of the ASK1-TBD·TRX1 Complex—To further refine the structural details of ASK1-TBD and its complex with TRX1, a structural model of ASK1-TBD was generated. Because the sequence 88–302 of ASK1 lacks homology to any known structures, its models were created by *ab initio* modeling using I-TASSER, Phyre2, and Robetta servers (32–34). However, only one of the models calculated by the Robetta server showed reasonable agreement not only with the SAXS-based envelope (Figs. 7, A and B, the back-calculated scattering curve based on this model fits the SAXS data with χ^2 values of 0.91) but also with the secondary structure prediction and the results of time-resolved fluorescence measurements that suggested all Trp residues that replaced Phe residues at four different positions within ASK1-TBD are likely buried and located in relatively rigid areas (Table 2). The superposition of this model with the SAXS-based envelope is shown in Fig. 7A. The model indicates that the C-terminal part of ASK1-TBD contains a ~ 50 residue long α -helix that protrudes from the more spherical N-terminal part with the 3-layer α/β sandwich architecture. The comparison of SAXS-based envelopes suggests TRX1 interacts with the N-terminal bulkier part of ASK1-TBD. Fig. 7C shows a superposition of the SAXS envelope of the ASK1-TBD·TRX1 complex with its model, which was created by inserting a crystal structure of TRX1 (37) into the empty part of the complex envelope. The shape and size of the SAXS-based envelope allowed for the TRX1 molecule to be oriented by its catalytic WCGPC motif (Fig. 7C, shown in yellow) toward to ASK1-TBD consistent with the tryptophan fluorescence data, which suggested the involvement of Trp³¹ in binding to ASK1-

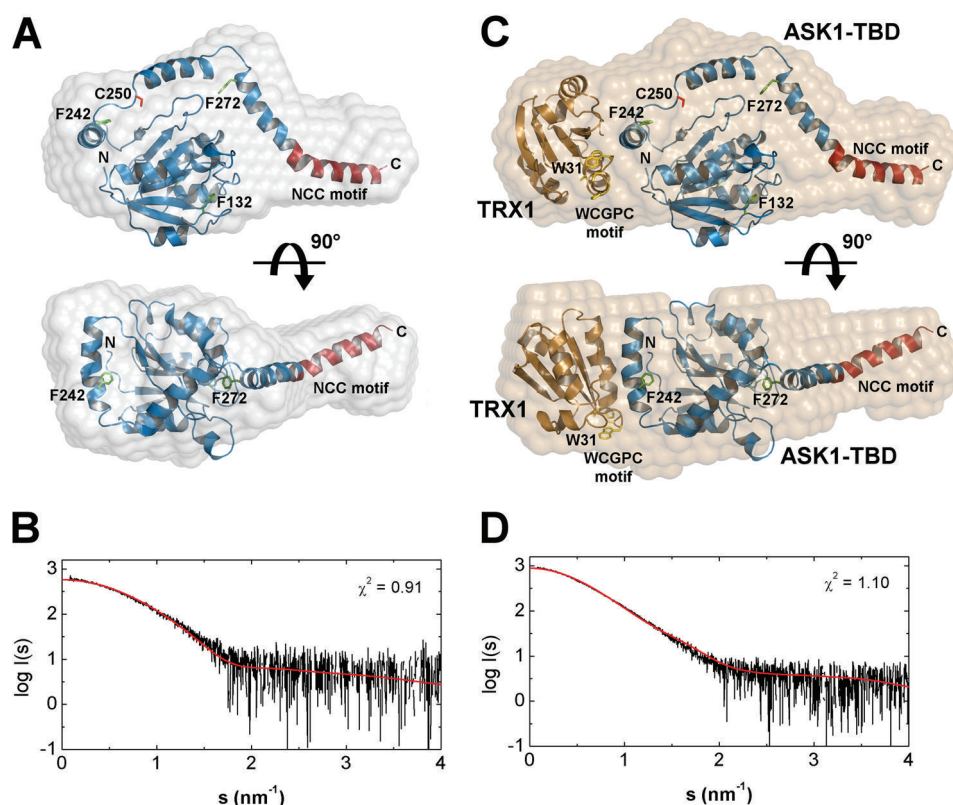


FIGURE 7. Superposition of SAXS envelopes with the *ab initio* models of ASK1-TBD and the ASK1-TBD-TRX1 complex. *A*, superposition of the SAXS envelope with the theoretical model of ASK1-TBD (sequence 88–302) obtained by *ab initio* modeling using Robetta (34). The N-terminal CC motif of ASK1 is shown in dark red. The residues that were mutated to Trp are shown in green. Cys²⁵⁰ is shown in red. *B*, comparison of the calculated scattering curve of the theoretical model of ASK1-TBD (red line) with the experimental scattering data (black line). *C*, superposition of the SAXS envelope with the model of the ASK1-TBD-TRX1 complex that was created using the theoretical model of ASK1-TBD and the crystal structure of human TRX1 (37). The catalytic ³¹WCGPC³⁵ motif of TRX1 is shown in yellow. *D*, comparison of the calculated scattering curve of the theoretical model of the ASK1-TBD-TRX1 complex (red line) with the experimental scattering data (black line).

TBD. The accuracy of this model was also assessed by calculating and comparing its theoretical SAXS scattering profile with the experimental scattering curve and the calculated scattering curve fitted the SAXS data well with χ^2 values of 1.10 (Fig. 7D).

ASK1 Residue Cys²⁵⁰ Is Located in the Vicinity of TRX1-binding Surface—The *ab initio* model of ASK1-TBD indicated that the TRX1-binding site is located in the vicinity of the Cys²⁵⁰ residue located at the N-terminal end of the long α -helix, which forms the C terminus of modeled ASK1-TBD (Fig. 7C). The mutation of this residue inhibits the interaction between ASK1 and TRX1 (16, 17). To check whether the same holds true for the isolated ASK1-TBD, mutant C250S was prepared and its interaction with TRX1 was characterized using both SV AUC and time-resolved fluorescence measurements. Analysis of the s_w isotherm as a function of reduced TRX1 concentration revealed that ASK1-TBD C250S exhibits a significantly lower binding affinity compared with WT with the best-fit K_D of $50 \pm 10 \mu\text{M}$ using 1:1 Langmuir binding model (Fig. 8A).

To further investigate the effect of the C250S mutation on the interaction between ASK1 and TRX1, time-resolved fluorescence measurements of Trp³¹ of TRX1 were performed. Measurements of the emission anisotropies revealed different hydrodynamic properties of TRX1 Trp³¹ when interacting with the ASK1-TBD C250S mutant compared with WT (Table 1 and Fig. 8B). Data analysis revealed four classes of correlation times, one unresolved and very short ($\phi_1 < 100$ ps), two longer corre-

sponding to segmental motions (ϕ_2 and ϕ_3 close to 1.3 and 3.8 ns, respectively), and the fourth correlation time $\phi_{\text{long}} = 38$ ns reflects the overall rotational motion of the complex (Table 1, Fig. 8B). The simultaneous presence of correlation times observed either for TRX1 alone (ϕ_1 and ϕ_2) or TRX1 bound to ASK1-TBD (ϕ_3) suggests an incomplete complex formation when only a portion of TRX1 is bound to ASK1-TBD C250S. This conclusion is fully consistent with results of SV AUC measurements showing that TRX1 interacts with ASK1-TBD C250S with weaker affinity compared with ASK1-TBD WT. Moreover, a significantly longer mean excited state lifetime of Trp³¹ was observed in this case. In particular, $\tau_{\text{mean}} = 4.52$ ns for the ASK1-TBD C250S-TRX1 complex compared with 3.34 ns for the ASK1-TBD WT-TRX1 complex. This suggests that Trp³¹ of TRX1 interacts with ASK1-TBD C250S by the altered way, likely as a result of either different conformations of ASK1-TBD or different interactions at the binding interface. Taken together, both SV AUC and time-resolved fluorescence measurements revealed the ASK1 Cys²⁵⁰ residue is likely located either at or in close vicinity of TRX1-binding site and is crucial for the interaction between ASK1 and TRX1.

DISCUSSION

In the present study, our main aim was to provide a structural insight into the interaction between ASK1 and reduced TRX1. TRX1, a ubiquitous oxidoreductase, was identified as a physiolog-

Low-resolution Structure of the ASK1-TRX1 Complex

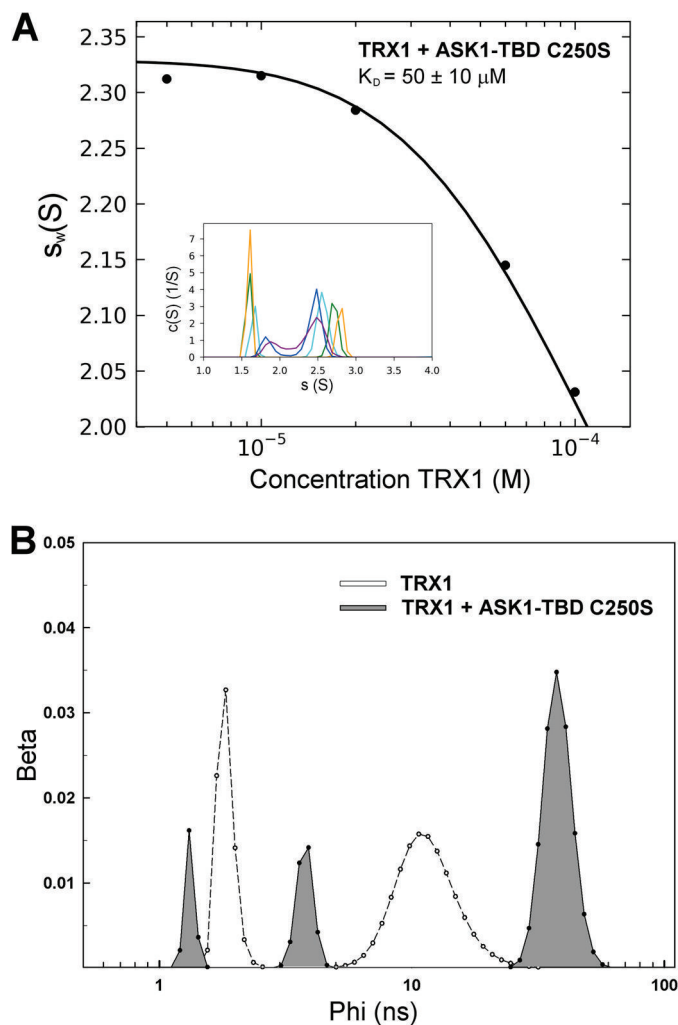


FIGURE 8. ASK1 residue Cys²⁵⁰ is important for the interaction between ASK1-TBD and TRX1. *A*, sedimentation velocity ultracentrifugation. The s_w isotherm obtained from SV AUC experiments of mixtures of ASK1-TBD C250S (20 μM) and TRX1 (5–100 μM). The inset shows the sedimentation coefficient distributions $c(s)$ of mixtures of ASK1-TBD C250S and TRX1 at various concentrations and molar ratios underlying the s_w data points. *B*, rotational correlation time distribution of Trp³¹ (TRX1) in the absence and presence of ASK1-TBD C250S. The unresolved component with very short correlation time ($\phi_1 < 100$ ps) observed in the fluorescence anisotropy decay of TRX1 alone is not shown.

ical inhibitor of ASK1, which interacts with the N-terminal region of ASK1 preventing homophilic oligomerization through the N-terminal CC domain of ASK1. Only the reduced form of TRX, but not the oxidized form where both Cys residues from the redox catalytic ³¹WCGPC³⁵ motif form an intramolecular disulfide bond, interacts with ASK1 (1, 9, 10, 18). However, the precise mechanisms of TRX1 binding to ASK1 as well as its dissociation are still unclear as no structural data are available on ASK1-TBD and its interaction with TRX1.

Screening of several constructs containing ASK1 sequences between residues 46 and 302 showed that only the C terminally His-tagged sequence 88–302 enables the preparation of a soluble and stable protein that binds reduced TRX1 with 1:1 molar stoichiometry and K_D of ~ 300 nM (Fig. 2A). On the other hand, oxidized TRX1 showed significantly lower binding affinity with K_D of $6 \pm 2 \mu\text{M}$ (Fig. 2B), confirming the oxidation of TRX1 hinders its interaction with ASK1. However, the mechanism

behind the lower binding affinity of oxidized TRX1 is still unclear. It has been suggested the oxidation of TRX1 generates an intramolecular disulfide bond between Cys³² and Cys³⁵ within the redox catalytic motif and this, in turn, causes the dissociation of TRX1 from ASK1 (1, 9, 18). This hypothesis is supported by the fact the redox inactive TRX1-CS mutant, in which both Cys³² and Cys³⁵ from the catalytic motif are replaced by Ser, does not bind to ASK1 (1, 9, 18). SV AUC experiments revealed that the TRX1-CS mutant exhibits negligible binding affinity for ASK1-TBD (with K_D of ~ 1 mM, Fig. 2C), confirming previous observations and suggesting these active site Cys residues play an important role in TRX1 binding to ASK1. In addition, our data also suggest that the interaction between ASK1-TBD and reduced TRX1 does not involve the formation of intermolecular disulfide bridges as SV AUC experiments were performed under reducing conditions and all obtained SV AUC data can be adequately fitted using the reversible Langmuir-type kinetic model.

Under strong oxidative conditions or at high protein concentrations human TRX1 forms homodimers covalently linked through the non-active site cysteine 73 (37). Because the TRX1 C73S mutant was used throughout this work to avoid formation of these homodimers, it is necessary to keep in mind data presented in this work cannot assess the potential role of this residue in the interaction between TRX1 and ASK1.

The catalytic motif of human TRX1 also contains a conserved tryptophan residue Trp³¹, which undergoes a subtle conformational change upon both TRX1 oxidation, when Cys³² and Cys³⁵ are disulfide linked, and the replacement of Cys³² and Cys³⁵ by Ser (the TRX1-CS mutant) (37, 38). Crystallographic analysis revealed that Trp³¹ is partially disordered in reduced form, but ordered in TRX1-CS and oxidized TRX1. This resemblance of TRX1-CS and oxidized TRX1 also likely contributes to the ability of the TRX1-CS mutant to act as a competitive inhibitor of thioredoxin reductase (44). Because both TRX1-CS and oxidized TRX1 were shown to be unable to bind to ASK1 (1, 9, 10, 18), it is entirely possible the similarity in the conformational behavior of Trp³¹ might contribute to their inability to bind to ASK1. Consistent with this hypothesis, results of our experiments strongly suggest that Trp³¹ is directly involved in TRX1 binding to ASK1-TBD. First, the W31F mutation significantly reduced TRX1 binding affinity for ASK1-TBD (Fig. 2D). Next, the time-resolved tryptophan fluorescence measurements showed the TRX1 binding to ASK1-TBD both increases τ_{mean} and suppresses the segmental dynamics of Trp³¹. In the free TRX1, Trp³¹ exhibits relatively short τ_{mean} and a fast emission depolarization, suggesting this residue is exposed to the solvent and highly mobile, in a good agreement with its surface-exposed location (Fig. 4C) as well as partially disordered nature observed in structural studies (37). The longer τ_{mean} and a slower and/or more restricted local and segmental motion of Trp³¹ in the presence of ASK1-TBD suggest the motional restriction of the catalytic motif and a lower accessibility of Trp³¹ to polar environment and/or suppressed quenching interactions in its vicinity upon complex formation (39, 40). Because Trp³¹ is located on the surface of the TRX1 molecule (Fig. 4C), it is reasonable to interpret observed changes as a direct involvement of this residue in TRX1 binding to ASK1-TBD.

The SAXS experiments revealed ASK1-TBD is monomeric in solution and adopts a compact and slightly asymmetric shape with one side being narrower than the other (Fig. 6C). The shape of the ASK1-TBD-TRX1 complex is similar but more extended within its thicker part (Fig. 6D). The comparison of obtained envelopes suggests that TRX1 interacts with the thicker end of the ASK1-TBD molecule through the large binding interface without inducing any dramatic structural change, although a local conformational change, which is beyond the resolution of this method, cannot be ruled out. *Ab initio* molecular modeling, although speculative as the 88–302 sequence of ASK1 lacks homology to any known structures, provided a structural model that shows reasonable agreement with the SAXS-based envelope, the secondary structure prediction, and the results of time-resolved tryptophan fluorescence measurements (Fig. 7, Table 2). This structural model suggests TRX1 interacts with the bulkier part of ASK1-TBD close to the N terminus of the long α -helix that protrudes from the more spherical part of ASK1-TBD and forms its C-terminal end. This long α -helix contains approximately one-half of the N-terminal CC motif of ASK1, based on the prediction using the COILS program (45), located between residues ~285 and 320 (shown in red in Fig. 7). It has been suggested the TRX1 binding to the N-terminal part of ASK1 blocks its homophilic interaction through this N-terminal CC motif that is required for ASK1 autophosphorylation and activation (9). Our structural model is consistent with this hypothesis as TRX1 binding close to the N-terminal end of this long α -helix might affect its conformation and its coiled-coil interactions. In addition, both SV AUC and the time-resolved fluorescence measurements suggested that ASK1 residue Cys²⁵⁰, which has been shown to be important for both TRX1 binding and the oxidative stress-dependent signaling downstream of ASK1 (16, 17), is located either at or in close vicinity of the TRX1-binding site (Fig. 8, Table 1) consistent with our structural model (Fig. 7).

Taken together, biophysical and structural characterization of the isolated TRX1-binding region of ASK1 revealed that this part of ASK1 is a monomeric and rigid domain that forms a stable equimolar complex with reduced TRX1. Residues from the catalytic ³¹WCGPC³⁵ motif of TRX1 are essential for TRX1 binding to ASK1-TBD and the interaction does not involve the formation of intermolecular disulfide bonds. Time-resolved tryptophan fluorescence suggested a direct involvement of Trp³¹ in the TRX1 binding to ASK1. SAXS data revealed a compact and slightly asymmetric shape of ASK1-TBD and suggested TRX1 interacts with this domain through the large binding interface without inducing any dramatic conformational change. Molecular modeling indicated the TRX1-binding site is located close to the N-terminal end of a ~50-residue long α -helix that forms the C terminus of ASK1-TBD. In addition, our results also show that ASK1 residue Cys²⁵⁰ is likely located either at or in close vicinity to the TRX1-binding surface.

Acknowledgment—We thank Dr. Karen Iorio for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., and Ichijo, H. (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.* **17**, 2596–2606
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., and Ichijo, H. (2002) ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev.* **16**, 1345–1355
- Takeda, K., Matsuzawa, A., Nishitoh, H., Tobiume, K., Kishida, S., Ni-nomiya-Tsujii, J., Matsumoto, K., and Ichijo, H. (2004) Involvement of ASK1 in Ca²⁺-induced p38 MAP kinase activation. *EMBO Rep.* **5**, 161–166
- Kawarazaki, Y., Ichijo, H., and Naguro, I. (2014) Apoptosis signal-regulating kinase 1 as a therapeutic target. *Expert Opin. Ther. Targets* **18**, 651–664
- Tobiume, K., Saitoh, M., and Ichijo, H. (2002) Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced activating phosphorylation of pre-formed oligomer. *J. Cell Physiol.* **191**, 95–104
- Bunkoczi, G., Salah, E., Filippakopoulos, P., Fedorov, O., Müller, S., Sobott, F., Parker, S. A., Zhang, H., Min, W., Turk, B. E., and Knapp, S. (2007) Structural and functional characterization of the human protein kinase ASK1. *Structure* **15**, 1215–1226
- Noguchi, T., Takeda, K., Matsuzawa, A., Saegusa, K., Nakano, H., Gohda, J., Inoue, J., and Ichijo, H. (2005) Recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins to apoptosis signal-regulating kinase 1 signalosome is essential for oxidative stress-induced cell death. *J. Biol. Chem.* **280**, 37033–37040
- Zhang, L., Chen, J., and 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
- Fujino, G., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Yamauchi, S., Saitoh, M., Takeda, K., and Ichijo, H. (2007) Thioredoxin and TRAF family proteins regulate reactive oxygen species-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-terminal homophilic interaction of ASK1. *Mol. Cell Biol.* **27**, 8152–8163
- Liu, H., Nishitoh, H., Ichijo, H., and Kyriakis, J. M. (2000) Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. *Mol. Cell Biol.* **20**, 2198–2208
- Powis, G., and Montfort, W. R. (2001) Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**, 421–455
- Qin, J., Clore, G. M., Kennedy, W. M., Huth, J. R., and Gronenborn, A. M. (1995) Solution structure of human thioredoxin in a mixed disulfide intermediate complex with its target peptide from the transcription factor NF κ B. *Structure* **3**, 289–297
- Huber, H. E., Russel, M., Model, P., and Richardson, C. C. (1986) Interaction of mutant thioredoxins of *Escherichia coli* with the gene 5 protein of phage T7: the redox capacity of thioredoxin is not required for stimulation of DNA polymerase activity. *J. Biol. Chem.* **261**, 15006–15012
- Hwang, C. Y., Ryu, Y. S., Chung, M. S., Kim, K. D., Park, S. S., Chae, S. K., Chae, H. Z., and Kwon, K. S. (2004) Thioredoxin modulates activator protein 1 (AP-1) activity and p27 Kip1 degradation through direct interaction with Jab1. *Oncogene* **23**, 8868–8875
- Holmgren, A., Söderberg, B. O., Eklund, H., and Brändén, C. I. (1975) Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.8-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 2305–2309
- Zhang, R., Al-Lamki, R., Bai, L., Streib, J. W., Miano, J. M., Bradley, J., and Min, W. (2004) Thioredoxin-2 inhibits mitochondria-located ASK1-mediated apoptosis in a JNK-independent manner. *Circ. Res.* **94**, 1483–1491
- Nadeau, P. J., Charette, S. J., and Landry, J. (2009) REDOX reaction at ASK1-Cys²⁵⁰ is essential for activation of JNK and induction of apoptosis. *Mol. Biol. Cell* **20**, 3628–3637
- Liu, Y., and Min, W. (2002) Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner. *Circ. Res.* **90**, 1259–1266
- Nadeau, P. J., Charette, S. J., Toledano, M. B., and Landry, J. (2007) Disul-

Low-resolution Structure of the ASK1·TRX1 Complex

- fide bond-mediated multimerization of Ask1 and its reduction by thioredoxin-1 regulate H₂O₂-induced c-Jun NH₂-terminal kinase activation and apoptosis. *Mol. Biol. Cell* **18**, 3903–3913
20. Tan, S. (2001) A modular polycistronic expression system for overexpressing protein complexes in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **21**, 224–234
 21. Hashemy, S. I., and Holmgren, A. (2008) Regulation of the catalytic activity and structure of human thioredoxin 1 via oxidation and S-nitrosylation of cysteine residues. *J. Biol. Chem.* **283**, 21890–21898
 22. Rezakboka, L., Kacirova, M., Sulc, M., Herman, P., Vecer, J., Stepanek, M., Obsilova, V., and Obsil, T. (2012) Structural modulation of phosphoducin by phosphorylation and 14-3-3 protein binding. *Biophys. J.* **103**, 1960–1969
 23. Vecer, J., and Herman, P. (2011) Maximum entropy analysis of analytically simulated complex fluorescence decays. *J. Fluoresc.* **21**, 873–881
 24. Schuck, P. (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys. J.* **78**, 1606–1619
 25. Dam, J., Velikovskiy, C. A., Mariuzza, R. A., Urbanke, C., and Schuck, P. (2005) Sedimentation velocity analysis of heterogeneous protein-protein interactions: Lamm equation modeling and sedimentation coefficient distributions *c(s)*. *Biophys. J.* **89**, 619–634
 26. Roessle, M. W., Klaering, R., Ristau, U., Robrahn, B., Jahn, D., Gehrman, T., Konarev, P., Round, A., Fiedler, S., Hermes, C., and Svergun, D. (2007) Upgrade of the small-angle x-ray scattering beamline X33 at the European Molecular Biology Laboratory, Hamburg. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, S190–S194
 27. Guinier, A. (1939) La diffraction des rayons X aux très faibles angles: applications à l'étude des phénomènes ultra-microscopiques. *Ann. Phys. Paris* **12**, 161–237
 28. Svergun, D. I. (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Crystallogr.* **25**, 495–503
 29. Svergun, D. I. (1999) Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys. J.* **76**, 2879–2886
 30. Volkov, V. V., and Svergun, D. I. (2003) Uniqueness of *ab initio* shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Crystallogr.* **36**, 860–864
 31. Whitmore, L., and Wallace, B. A. (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res.* **32**, W668–673
 32. Zhang, Y. (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9**, 40
 33. Kelley, L. A., and Sternberg, M. J. (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.* **4**, 363–371
 34. Song, Y., DiMaio, F., Wang, R. Y., Kim, D., Miles, C., Brunette, T., Thompson, J., and Baker, D. (2013) High-resolution comparative modeling with RosettaCM. *Structure* **21**, 1735–1742
 35. Svergun, D., Barberato, C., and Koch, M. H. J. (1995) CRY SOL: a program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J. Appl. Crystallogr.* **28**, 768–773
 36. Forman-Kay, J. D., Clore, G. M., Stahl, S. J., and Gronenborn, A. M. (1992) ¹H and ¹⁵N resonance assignments and secondary structure of the human thioredoxin C62A, C69A, C73A mutant. *J. Biomol. NMR* **2**, 431–445
 37. Weichsel, A., Gasdaska, J. R., Powis, G., and Montfort, W. R. (1996) Crystal structures of reduced, oxidized, and mutated human thioredoxins: evidence for a regulatory homodimer. *Structure* **4**, 735–751
 38. Qin, J., Clore, G. M., and Gronenborn, A. M. (1994) The high-resolution three-dimensional solution structures of the oxidized and reduced states of human thioredoxin. *Structure* **2**, 503–522
 39. Lakowicz, J. R. (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Second Ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York
 40. Schauerte, J. A., and Gafni, A. (1989) Long-lived tryptophan fluorescence in phosphoglycerate mutase. *Biochemistry* **28**, 3948–3954
 41. Andrade, M. A., Chacón, P., Merelo, J. J., and Morán, F. (1993) Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng.* **6**, 383–390
 42. Jones, D. T. (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* **292**, 195–202
 43. Kelly, S. M., and Price, N. C. (2000) The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr. Protein Peptide Sci.* **1**, 349–384
 44. Oblong, J. E., Berggren, M., Gasdaska, P. Y., and Powis, G. (1994) Site-directed mutagenesis of active site cysteines in human thioredoxin produces competitive inhibitors of human thioredoxin reductase and elimination of mitogenic properties of thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **269**, 11714–11720
 45. Lupas, A., Van Dyke, M., and Stock, J. (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**, 1162–1164

Publikace 3

Kopecka, M., Kosek, D., Kukacka, Z., Rezabkova, L., Man, P., Novak, P., Obsil, T., Obsilova, V.: *Role of the EF-hand-like motif in the 14-3-3 protein-mediated activation of yeast neutral trehalase Nth1*, J. Biol. Chem., 289, 13948-61 (2014)

Podíl autora na publikaci:

V rámci této publikace jsem všechna měření sedimentačních rychlostí společně s následným zpracováním, analýzou a interpretací sedimentačních dat.

Role of the EF-hand-like Motif in the 14-3-3 Protein-mediated Activation of Yeast Neutral Trehalase Nth1*

Received for publication, December 27, 2013, and in revised form, March 20, 2014. Published, JBC Papers in Press, April 8, 2014, DOI 10.1074/jbc.M113.544551

Miroslava Kopecka^{‡§}, Dalibor Kosek^{‡¶}, Zdenek Kukacka^{||**}, Lenka Rezabkova^{‡¶}, Petr Man^{||**}, Petr Novak^{||**}, Tomas Obsil^{‡¶}, and Veronika Obsilova^{‡¶1}

From the [‡]Institute of Physiology and the ^{||}Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic v.v.i., Videnska 1083, 14220 Prague, Czech Republic, the [§]Second Faculty of Medicine, Charles University, V Uvalu 84, 150 06 Prague, Czech Republic, and the Departments of [¶]Physical and Macromolecular Chemistry and ^{**}Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 2030, 12843 Prague, Czech Republic

Background: The yeast neutral trehalase Nth1 is activated by the 14-3-3 protein binding.

Results: The 14-3-3 protein induces a structural rearrangement of Nth1 with changes within the EF-hand like motif being essential for the activation process.

Conclusion: The EF-hand-like motif-containing domain is crucial for the 14-3-3-dependent activation of Nth1.

Significance: Structural basis of the mechanism of Nth1 activation.

Trehalases hydrolyze the non-reducing disaccharide trehalose amassed by cells as a universal protectant and storage carbohydrate. Recently, it has been shown that the activity of neutral trehalase Nth1 from *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by the 14-3-3 protein binding that modulates the structure of both the catalytic domain and the region containing the EF-hand-like motif, whose role in the activation of Nth1 is unclear. In this work, the structure of the Nth1·14-3-3 complex and the importance of the EF-hand-like motif were investigated using site-directed mutagenesis, hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry, chemical cross-linking, and small angle x-ray scattering. The low resolution structural views of Nth1 alone and the Nth1·14-3-3 complex show that the 14-3-3 protein binding induces a significant structural rearrangement of the whole Nth1 molecule. The EF-hand-like motif-containing region forms a separate domain that interacts with both the 14-3-3 protein and the catalytic trehalase domain. The structural integrity of the EF-hand like motif is essential for the 14-3-3 protein-mediated activation of Nth1, and calcium binding, although not required for the activation, facilitates this process by affecting its structure. Our data suggest that the EF-hand like motif-containing domain functions as the intermediary through which the 14-3-3 protein modulates the function of the catalytic domain of Nth1.

Trehalose (α -D-glucopyranosyl-(1-1)- α -D-glucopyranoside) is a non-reducing disaccharide of glucose found in a broad variety of organisms, including bacteria, yeast, fungi, insects, and plants, with the exception of mammalian cells. The generation of trehalose is triggered by stresses, such as heat, drying, or

oxidative stress, indicating that the accumulated trehalose protects proteins and membranes from these stress conditions. Moreover, it can also act as a signaling or regulatory molecule in some cells, connecting the trehalose metabolism to glucose transport and glycolysis (1).

Hydrolysis of trehalose into two glucose subunits is carried out by trehalases (2). Trehalase was first described in *Aspergillus niger* and then in *Saccharomyces cerevisiae* and subsequently in many other organisms, including plants and animals (3–6). It has been shown that the yeast *S. cerevisiae* possesses several different trehalases: the vacuolar acid trehalase Ath1 with a lower pH optimum of about 4.5, and the cytoplasmic neutral trehalases Nth1 and Nth2 with a pH optimum of about 7 (7–10). The sequence comparison revealed that neutral trehalases from yeast *S. cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis* possess, compared with other organisms, an N-terminal extension that contains several protein kinase A (PKA) phosphorylation sites as well as the EF-hand-like calcium binding motif, suggesting that this region is involved in the regulation of these enzymes' activity (11–13). Indeed, it has recently been shown that the activity of *S. cerevisiae* Nth1 is regulated by PKA phosphorylation, Ca^{2+} , and the 14-3-3 protein binding (14–16).

In yeast *S. cerevisiae*, two 14-3-3 protein isoforms (Bmh1 and Bmh2) with a great degree of homology have been identified (17). Bmh1 and Bmh2 were shown to be essential in most laboratory yeast strains (18). As in higher eukaryotes, yeast 14-3-3 proteins bind to and modulate the activity of plenty of proteins involved in crucial cellular processes (19). In our previous study, we identified two key phosphorylation sites within the N-terminal segment of *S. cerevisiae* Nth1 that are responsible for the 14-3-3 protein-mediated activation of Nth1 (15). This activation is significantly more potent compared with the Ca^{2+} only-dependent activation, which is more common among trehalases from other organisms. Subsequently, we showed that the 14-3-3 protein binding affects the conformation of both the region containing the EF-hand-like motif and the catalytic trehalase domain (Fig. 1), with changes in the EF-hand-like motif being, surprisingly, most profound (20). Thus, these data sug-

* This work was supported by Czech Science Foundation Project P207/11/0455; Grant Agency of Charles University Grants 644313 and 800413; and Academy of Sciences of the Czech Republic Research Projects RVO: 67985823 of the Institute of Physiology and RVO: 61388971 of the Institute of Microbiology. Access to MS facilities was supported by Academy of Sciences of the Czech Republic Project OPK CZ.2.16/3.1.00/24023.

¹ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 420-241062191; Fax: 420-244472269; E-mail: obsilova@biomed.cas.cz.

gested that this motif plays an important, although unclear, role in the activation of *S. cerevisiae* Nth1.

In this work, the structure of the Nth1-14-3-3 complex and the importance of the EF-hand-like motif located between residues 114 and 125 in the activation of Nth1 were investigated using the site-directed mutagenesis, the hydrogen/deuterium exchange (HDX)² coupled to mass spectrometry (HDX-MS), chemical cross-linking, and small angle x-ray scattering (SAXS). The low resolution structural views of Nth1 alone and the Nth1-14-3-3 complex show that the 14-3-3 protein binding induces a significant structural rearrangement of the whole Nth1 molecule. The EF-hand-like motif-containing region forms a separate domain that interacts with both the 14-3-3 protein and the catalytic trehalase domain. The structural integrity of the EF-hand-like motif is essential for the 14-3-3 protein-mediated activation of Nth1, and calcium binding, although not required for the activation, facilitates this process by affecting its structure. Our data suggest that the EF-hand like motif-containing domain functions as the intermediary through which the 14-3-3 protein modulates the function of the catalytic domain of Nth1.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Expression and Purification of Bmh1—DNA encoding *S. cerevisiae* Bmh1 protein was ligated into pET-15b (Novagen) using the NdeI and BamHI sites (21). The histidine-tagged protein was expressed by isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside induction for 5 h at 37 °C and purified from *E. coli* BL21(DE3) using chelating Sepharose® Fast Flow (GE Healthcare) using the standard protocol. Next, Bmh1 was purified by anion exchange chromatography using Q Sepharose® Fast Flow (GE Healthcare). The protein was eluted using a linear gradient of NaCl (50–1000 mM). Fractions containing Bmh1 were concentrated and further purified using size exclusion chromatography on a Superdex 75 10/300 GL column (GE Healthcare) in a buffer containing 20 mM Tris/HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, and 10% (w/v) glycerol. The protein concentration of purified Bmh1 was determined from UV absorption at 280 nm using an extinction coefficient value of 28,880 M⁻¹·cm⁻¹ (22).

Expression, Purification, and Phosphorylation of Nth1—Nth1 from *S. cerevisiae* was expressed, purified, and phosphorylated as described previously (15). To ensure that prepared Nth1 is calcium-free, the final purification step (the size exclusion chromatography) was done in the presence of either 1 mM EDTA or EGTA (in a buffer containing 20 mM Tris/HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA or 1 mM EGTA, 1 mM DTT, and 10% (w/v) glycerol). The protein concentration of purified Nth1 was determined from UV absorption at 280 nm using an extinction coefficient value of 142,560 M⁻¹·cm⁻¹ (22).

Mutants of Nth1 (D103L, D114L, D114E, D116L, K117L, N118L, I121L, D125L, D125E, and D173L) were created by using the QuikChangeTM approach (Stratagene). All mutations were confirmed by sequencing, and phosphorylation was checked by mass spectrometry.

Differential Scanning Fluorimetry—The thermofluor assay was performed using a real-time PCR LightCycler 480 II (Roche Applied Science). The proteins at a concentration of 0.2 mg/ml were tested in the presence of 8 \times concentrated Sypro Orange (Sigma-Aldrich) in a total reaction volume of 25 μ l in the LightCycler 480 Multiwell Plate 96 (Roche Applied Science). The plate was sealed with the LightCycler 480 Sealing Foil (Roche Applied Science), and a temperature gradient from 20 to 95 °C with a rate of 0.01 °C/s was applied. The wavelengths for fluorescence excitation and emission were 465 and 580 nm, respectively. The melting temperature values, T_m , corresponding to the inflection points of the melting curves, were determined as the minima of the negative first derivative using the Roche LightCycler 480 SW 1.5 software (23, 24).

Enzyme Activity Measurements—The trehalase activity of phosphorylated Nth1 (pNth1) WT and mutants was measured by estimating the glucose produced by hydrolysis of trehalose using a stopped assay as described previously (15, 25). Specific trehalase activity of pNth1 was measured in the presence and in the absence of Bmh1 and/or Ca²⁺. The final concentrations of pNth1, Bmh1, and Ca²⁺ were 100 nM, 15 μ M, and 10 mM, respectively. The calcium was added to the 50 μ l of reaction mixture from the 200 mM stock solution of CaCl₂. The assay was performed at 30 °C in buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% (w/v) glycerol, and 30 mM trehalose. Experiments performed in the absence of Ca²⁺ also contained 1 mM EDTA or EGTA. The production of glucose was detected using the Amplex® Red glucose/glucose oxidase assay kit (Invitrogen). The specific activity of trehalase was determined as μ mol of glucose liberated/min/mg of protein at 571 nm.

Near-UV Circular Dichroism (CD) Spectroscopy—The near-UV ECD spectra were measured in a quartz cuvette with an optical path length of 1 cm (Starna) using a J-810 spectropolarimeter (Jasco, Japan). The conditions of the measurements were as follows: a spectral region of 250–320 nm, a scanning speed of 10 nm·min⁻¹, a response time of 8 s, a resolution of 1 nm, a bandwidth of 1 nm, and a sensitivity of 100 millidegrees. The final spectrum was obtained as an average of five accumulations. The spectra were corrected for a base line by subtracting the spectra of the corresponding polypeptide-free solution. The ECD measurements were conducted at room temperature (23 °C) in buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2 mM 2-mercaptoethanol, 10% (w/v) glycerol buffer. The Bmh1 concentration was 0.45 mg·ml⁻¹, and the concentration of pNth1 WT and mutants was 0.69 mg·ml⁻¹. After baseline correction, the final spectra were expressed as mean residue ellipticities, Q_{MRW} (degrees·cm²·dmol⁻¹·number of residues⁻¹) and were calculated using the equation,

$$[Q]_{MRW} = \frac{\theta_{obs} M_r}{c l N_r 10} \quad (\text{Eq. 1})$$

² The abbreviations used are: HDX, H/D exchange; HDX-MS, H/D exchange coupled to mass spectrometry; SV, sedimentation velocity; DSG, disuccinimidyl glutarate; DSS, disuccinimidyl suberate; DSS(G)D0 and DSS(G)D4, non-deuterated and four-times deuterated cross-linkers disuccinimidyl suberate (disuccinimidyl glutarate), respectively; pNth1, phosphorylated Nth1; SAXS, small angle x-ray scattering; Nth1, yeast enzyme neutral trehalase; Bmh1, yeast 14-3-3 protein isoform.

Low Resolution Structure of the Bmh1·pNth1 Complex

where θ_{obs} is the observed ellipticity in millidegrees, c is the protein concentration in $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, l is the path length in cm, M_r is the protein molecular weight, and N_R is the number of amino acids in the protein (26).

Analytical Ultracentrifugation Measurements—Sedimentation velocity (SV) experiments were performed using a ProteomLab™ XL-I analytical ultracentrifuge (Beckman Coulter). SV experiments of Bmh1 and pNth1 were conducted at loading concentrations of 0.2–20 μM , 20 °C, and 42,000 or 48,000 revolutions/min rotor speed (An-50 Ti rotor, Beckman Coulter). All data were collected with absorbance optics at 280 nm. Samples were dialyzed against the buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 2 mM 2-mercaptoethanol before analysis. To study the effect of Ca^{2+} on the interaction, the dilution series of Bmh1 with constant concentration of pNth1 were analyzed with and without 10 mM CaCl_2 in the buffer solution. The $c(s)$ distributions were calculated from the raw absorbance data using the software package SEDFIT followed by fitting the chemical equilibrium using the Lamm equation modeling implemented in the software package SEDPHAT with the previously known s values of each component (27, 28). Loading concentrations were slightly corrected in the process of fitting.

Hydrogen/Deuterium Exchange Kinetics Coupled to Mass Spectrometry (HDX-MS)—HDX of the Bmh1 protein, pNth1 protein, both proteins in the presence and in the absence of 10 mM Ca^{2+} , and pNth1 in the presence of the Bmh1 protein and/or 10 mM Ca^{2+} was initiated by a 10-fold dilution in a deuterated buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH/pD 7.5), 1 mM EDTA, 3 mM DTT, 150 mM NaCl, and 10% (w/v) glycerol. The final protein concentrations were 3.16 μM for Bmh1 and 1.6 μM for phosphorylated Nth1. The molar ratio between Bmh1 and Nth1 was therefore 2:1. Aliquots (80 μl) were taken after 30 s, 1 min, 3 min, 10 min, 30 min, 1 h, 3 h, and 5 h of exchange. The exchange was quenched by adding 20 μl of 0.1 M HCl and rapid freezing in liquid nitrogen. Analysis was done as described previously (20, 29).

Chemical Cross-linking Combined with Mass Spectrometry—Both Bmh1 and pNth1 alone and pNth1 in the complex with Bmh1 were cross-linked using cross-linkers disuccinimidyl suberate (DSS) or disuccinimidyl glutarate (DSG). For the cross-linking reaction, all proteins were dialyzed against buffer containing 20 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, and the protein concentrations were as follows: pNth1, 0.25 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; Bmh1, 0.25 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. All proteins were cross-linked in the presence of 10 mM Ca^{2+} using non-deuterated cross-linkers (DSSD0 and DSGD0) and in the absence of Ca^{2+} using four-times deuterated cross-linkers (DSSD4 and DSGD4). Freshly prepared stock solutions of cross-linkers (5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ in DMSO) were added in a 15 \times and 30 \times molar excess to each protein alone or in a 50 \times and 100 \times molar excess to the pNth1·Bmh1 complex. The reaction mixtures were incubated for 2 h at room temperature. After that, samples that were cross-linked in the presence of Ca^{2+} with non-deuterated compounds were mixed with identical samples that were cross-linked in the absence of Ca^{2+} with deuterated compounds in a 1:1 molar ratio, and their analysis was performed as described previously (20, 30).

SAXS—SAXS data were collected on the European Molecular Biology Laboratory P12 beamline on the storage ring DORIS III (Deutsches Elektronen Synchrotron, Hamburg, Germany). The pNth1·Bmh1 protein complex and Nth1 were measured in a concentration range of 1.8–15 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Bmh1 was measured in a concentration range of 2.2–16.3 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Data analysis was performed using the ATSAS software suite (31). The data were averaged after normalization to the intensity of the transmitted beam, and the scattering of the buffer was subtracted using PRIMUS (32). The forward scattering ($I(0)$) and the radius of gyration (R_g) were evaluated using the Guinier approximation. The distance distribution function ($P(r)$) and the maximum particle dimension (D_{max}) were determined by the indirect Fourier transformation of the scattering data $I(s)$ using GNOM (33). The solute apparent molecular mass (MM_{exp}) was estimated by comparison of the forward scattering with that from reference solutions of bovine serum albumin (molecular mass 66 kDa). *Ab initio* molecular envelopes were computed using DAMMIN (34), which represents the protein by a collection of dummy atoms in a constrained volume with a maximum diameter defined experimentally by D_{max} . For each protein, 10 surfaces were generated and averaged using DAMAVER (35). The averaged surfaces were then used as the final SAXS three-dimensional structure.

RESULTS

The Integrity of the EF-hand-like Motif-containing Region Is Crucial for the 14-3-3 Protein-dependent Activation of Nth1—The catalytic activity of *S. cerevisiae* Nth1 is regulated by PKA-mediated phosphorylation followed by 14-3-3 binding, with Ca^{2+} playing an unclear regulatory role (14–16). Fig. 2A shows the activity of phosphorylated Nth1 (pNth1) in the presence of Ca^{2+} , Mg^{2+} , and Bmh1 (yeast 14-3-3 protein isoform). Samples with Bmh1 only also contained additional 1 mM EDTA or EGTA to ensure that no traces of metals were present. As can be seen, the Ca^{2+} only-dependent activity of pNth1 is very small, whereas Bmh1- and Bmh1 + Ca^{2+} -dependent activities are significantly higher, with the last one being a little bit more profound. No significant difference was observed for the Bmh1 only-dependent activity of pNth1 in the presence of either 1 mM EDTA or 1 mM EGTA; thus, only the activity in the presence of EDTA is shown. This activity ($54 \pm 1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) is somewhat lower compared with the activity measured in the absence of EDTA ($64\text{--}66 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ (20)). In addition, no significant activation was observed in the presence of Mg^{2+} alone, and the effect of Bmh1 + Mg^{2+} on pNth1 activity was similar to that of Bmh1 alone.

Franco *et al.* (13) showed that the Ca^{2+} -dependent activation of Nth1 from *Schizosaccharomyces pombe* is mediated by a conserved Ca^{2+} -binding EF-hand-like motif that is also present in *S. cerevisiae* Nth1 (sequence ¹¹⁴DTDKNYQITIED¹²⁵). To investigate the importance of this motif in *S. cerevisiae* pNth1 activation, we performed site-directed mutagenesis of several residues that correspond to both conserved and non-conserved positions from EF-hand motifs of numerous Ca^{2+} -binding proteins (Fig. 1B) (36, 37). We mutated residues Asp¹¹⁴, Asp¹¹⁶, Asn¹¹⁸, and Asp¹²⁵, which correspond to conserved positions 1, 3, 5, and 12 in EF-hand motifs participating in metal coordina-

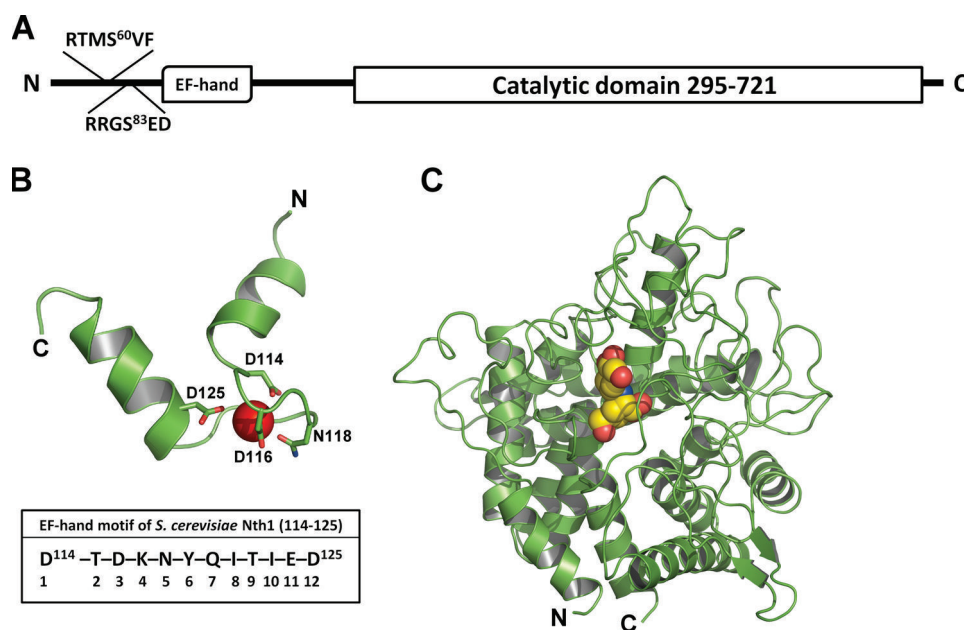


FIGURE 1. *A*, domain structure of *S. cerevisiae* Nth1. Relative positions of the 14-3-3 protein binding sites (Ser⁶⁰ and Ser⁸³), the EF-hand like motif (sequence 114–125), and the catalytic domain (sequence 295–721) are shown. *B*, the sequence and the model of the EF-hand like motif (sequence 114–125) of Nth1. Mutated residues important for metal coordination at positions 1, 3, 5, and 12 are shown in red. The structural model of the EF-hand like motif of Nth1 was created using Modeller version 9.12 (46) and the structure of the EF-hand motif of calmodulin (Protein Data Bank code 1EXR) as a template (47). *C*, three-dimensional model of the catalytic domain of yeast neutral trehalase Nth1 (sequence 295–721) was generated as described previously using the crystal structure of trehalase Tre37A from *E. coli* (Protein Data Bank code 2JF4, sequence 145–533) as a template. The active site contains trehalase inhibitor validoxyamine (shown as spheres), which was present in the structure of the template (20, 40).

tion, and residues Lys¹¹⁷ and Ile¹²¹ at non-conserved positions 4 and 8, respectively, which are not involved in metal coordination (36, 37). In addition, we also mutated residues Asp¹⁰³ and Asp¹⁷³ from regions bordering the EF-hand-like motif.

To verify that the introduced mutations did not result in an overall destabilization of the Nth1 structure, the stability of all prepared mutants was checked by measuring the thermally induced protein denaturation using differential scanning fluorimetry. No significant differences in the temperature of the unfolding transition (T_m) were observed for all Nth1 mutants with the exception of the I121L variant (Table 1). The slightly lower T_m of I121L mutant might reflect different conformation of the EF-hand-like motif because this residue (position) is known to be important for the proper conformation of the motif (36). The binding of selected phosphorylated Nth1 mutants to Bmh1 was also checked by using analytical ultracentrifugation, and no significant differences compared with pNth1 WT were observed (data not shown). Thus, all prepared Nth1 mutants were found to be suitable for trehalase activity measurements.

Next, the Bmh1-mediated activity of prepared pNth1 mutants in the absence and the presence of Ca²⁺ was measured (Fig. 2*B*). Although all mutants, with the exception of D116L, showed either significantly or totally suppressed Bmh1-mediated activity in the absence of Ca²⁺ (Fig. 2*B*, white bars), the presence of Ca²⁺ (Fig. 2*B*, gray bars) rescued the activity of all but the D114L, N118L, and D125L mutants. These three residues are located at positions crucial for metal coordination, and their replacement with Leu had the most profound effect on pNth1 activity both in the absence and the presence of Ca²⁺. On the other hand, mutations D114E and D125E, which should rescue the Ca²⁺ binding, showed high Bmh1-mediated activity

TABLE 1

Midpoint temperatures of the protein-unfolding transition (T_m) for Nth1 WT and mutants as determined using differential scanning fluorimetry

Uncertainties are the S.E. values calculated from three experiments.

Nth1 variant	T_m °C
WT	53.6 ± 0.3
D103L	52.3 ± 0.2
D114L	52.7 ± 0.2
D114E	53.4 ± 0.2
D116L	53.1 ± 0.1
K117L	53.6 ± 0.1
N118L	52.8 ± 0.5
I121L	50.4 ± 0.3
D125L	52.6 ± 0.2
D125E	53.3 ± 0.1
D173L	52.5 ± 0.1

but only in the presence of Ca²⁺. These data suggested not only that the structural integrity of the EF-hand like motif is essential for the Bmh1-mediated activation of pNth1 but also that calcium binding helps to mediate the activation process, probably through the structural stabilization of the EF-hand-like motif.

pNth1 Mutants D114L and D125L Show Conformational Behavior Similar to That of Wild Type—Trehalase activity measurements revealed that pNth1 mutants D114L and D125L are unable to get activated in the presence of Bmh1 (Fig. 2*B*), although their binding affinities for Bmh1 remain unchanged. To compare the conformational behavior of these two inactive mutants with pNth1 WT, near-UV CD spectra, which are sensitive to certain aspects of protein tertiary structure, of the pNth1 D114L·Bmh1, pNth1 D125L·Bmh1, and pNth1 WT·Bmh1 complexes (with 1:2 molar stoichiometry) were measured. The comparison of spectra of complexes with sums of the individual CD spectra of pNth variants and Bmh1 revealed no

Low Resolution Structure of the Bmh1-pNth1 Complex

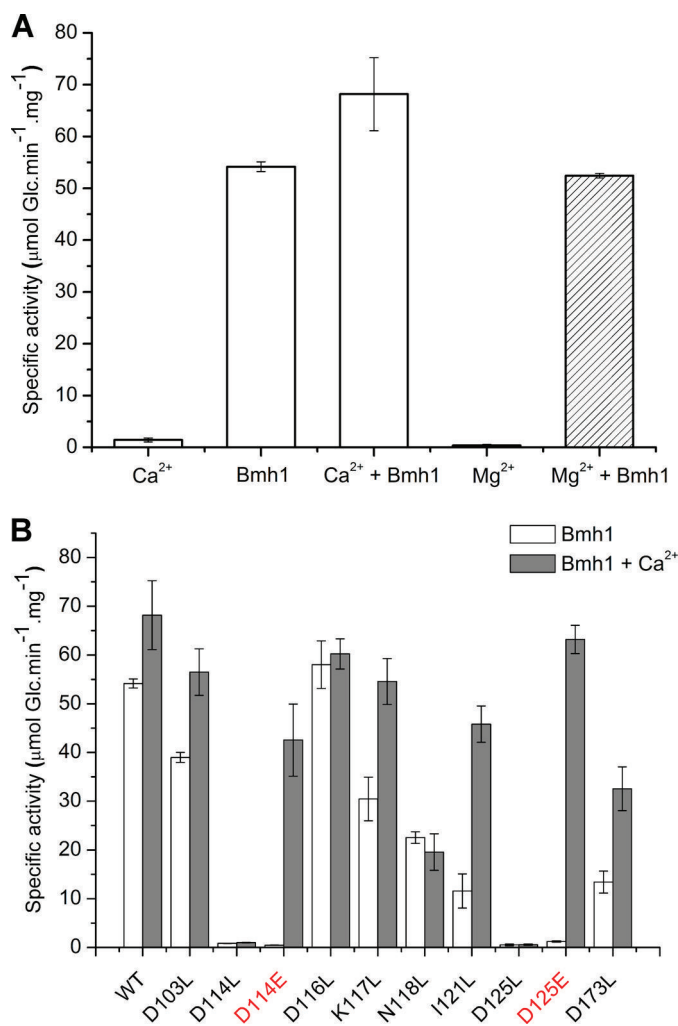


FIGURE 2. *A*, comparison of specific trehalase activities of pNth1 WT under different conditions. Data in the presence of 30 mM trehalose are shown. Specific activity of trehalase is expressed as μmol of glucose liberated/min/mg of protein. Results shown are means \pm S.D. from three experiments. *B*, specific trehalase activities of pNth1 WT, and mutants in the presence of Bmh1 (white bars) or Bmh1 + Ca²⁺ (gray bars). Data in the presence of 30 mM trehalose are shown. Specific activity of trehalase is expressed as μmol of glucose liberated/min/mg of protein. Results are means \pm S.D. (error bars) from three experiments.

significant differences between mutants D114L and D125L and pNth1 WT (Fig. 3). This suggested that the inability of these two mutants to become activated by Bmh1 is not due to the lack of the Bmh1-mediated conformational change (or interaction) but rather results from subtle differences in the conformation of the EF-hand-like motif-containing region that cannot be observed by this method.

Ca²⁺ Ions Do Not Affect the Dissociation Constant of the pNth1-Bmh1 Complex—Trehalase activity measurements revealed that several pNth1 mutants exhibit significantly higher activity in the presence of Bmh1 + Ca²⁺ compared with the presence of Bmh1 only (Fig. 2B). Therefore, we checked whether the presence of Ca²⁺ increases the stability of the pNth1-Bmh1 complex using analytical ultracentrifugation (sedimentation velocity method). Continuous distributions of sedimentation coefficients, $c(s)$, for mixtures of pNth1 and Bmh1 at five different molar ratios (from 5:1 to 1:20) both in the absence and the presence of Ca²⁺ are shown in Fig. 4. These

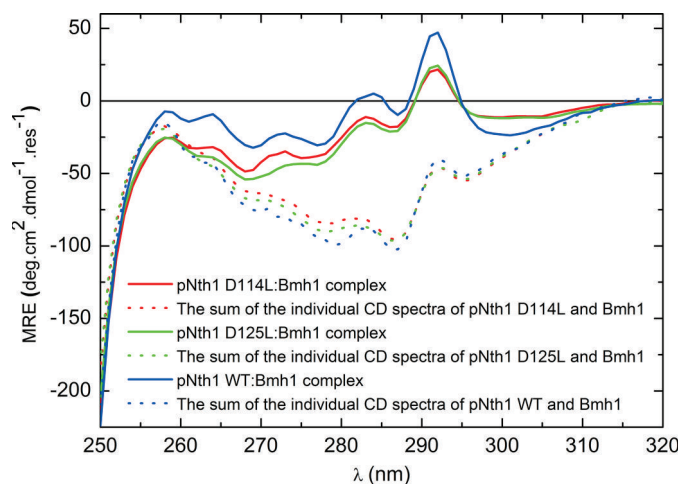


FIGURE 3. The comparison of the near-UV CD spectra of pNth1 D114L-Bmh1 (solid red line), pNth1 D125L-Bmh1 (solid green line), and pNth1 WT-Bmh1 (solid blue line) complexes with the sums of the individual CD spectra of pNth1 variants and Bmh1 (corresponding colored dotted lines). The mean residue ellipticity (MRE) is plotted as a function of wavelength in degrees $\cdot\text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1} \cdot \text{number of residues}^{-1}$.

distributions (normalized on the peak height) showed that Bmh1 and pNth1 form a complex with a weight-averaged sedimentation coefficient ($s_{w,20}$) of 7.2 S, whereas Bmh1 and pNth1 alone show single peaks with $s_{w,20}$ values of 3.6 and 5.1 S, respectively. The low abundance of the complex formation at 7.2 S for samples containing the lowest and the highest concentration of Bmh1 (0.2 and 20 μM , respectively) is due to the large excess of either pNth1 or Bmh1 in these mixtures (the concentration of pNth1 was 1 μM).

The analysis of sedimentation velocity data revealed no significant effect of Ca²⁺ on the apparent equilibrium dissociation constant (K_d) of the pNth1-Bmh1 complex because K_d values of 10×10^{-9} were determined both in the presence and the absence of 10 mM Ca²⁺. Thus, the more potent activation of pNth1 WT and mutants in the presence of Bmh1 + Ca²⁺ compared with that with Bmh1 only (Fig. 2B) cannot be explained by the increase in the binding affinity of pNth1 for Bmh1.

The EF-hand-like Motif of pNth1 Adopts Different Conformations in the Presence of Ca²⁺, Bmh1, and Bmh1 + Ca²⁺—Many proteins containing the EF-hand motif undergo a conformational change upon the Ca²⁺ binding (37). To investigate whether the same also holds true for pNth1, HDX-MS measurements were performed. HDX-MS experiments are based on monitoring the deuteration kinetics of backbone amides and enable characterization of protein dynamics and conformational changes because the rate of exchange of deuterium for hydrogen depends on both the solvent exposure and the hydrogen bonding of the studied region (38, 39). Results of these experiments are presented in Figs. 5 and 6. For the sake of comparison, these figures also show previously published data obtained in the absence of Ca²⁺ for pNth1 alone, Bmh1 alone, and the pNth1-Bmh1 complex (20).

Structural Changes within the EF-hand-like Motif-containing Region—The comparison of HDX-MS data for pNth1 in the presence of Ca²⁺, Bmh1, and Bmh1 + Ca²⁺ revealed large differences in the deuteration kinetics for five peptides from the region containing the EF-hand-like motif under all conditions

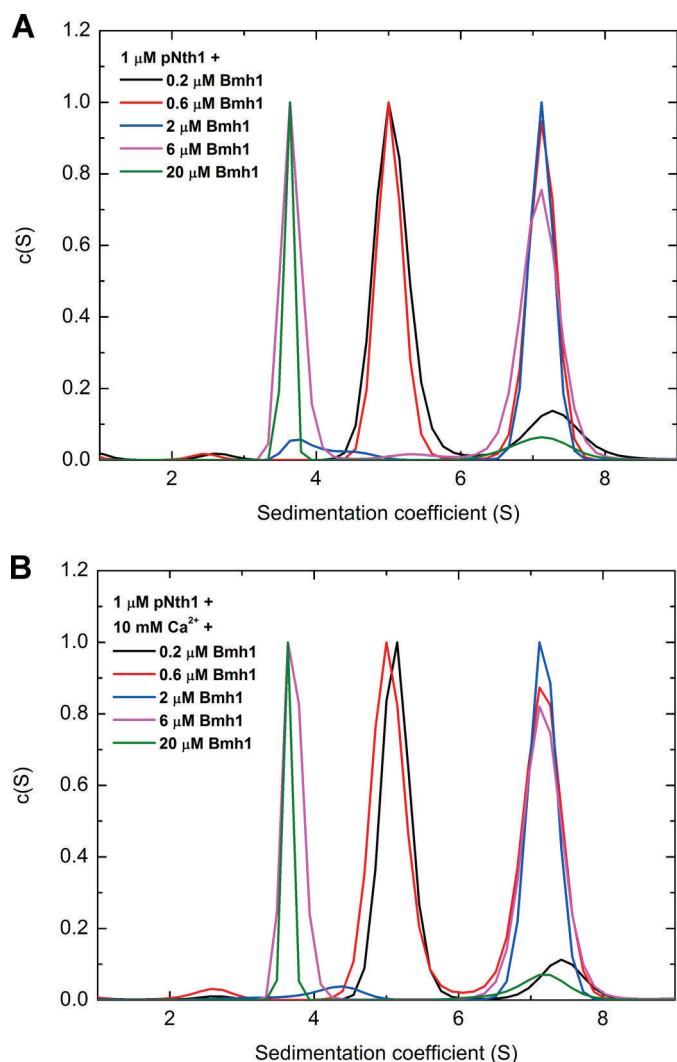


FIGURE 4. Sedimentation velocity analysis reveals that the binding affinity of pNth1 for Bmh1 is unchanged in the presence of Ca^{2+} . Continuous distributions of sedimentation coefficients, $c(s)$, for mixtures containing constant concentration of pNth1 ($1 \mu\text{M}$) and different concentrations of Bmh1 (0.2 – $20 \mu\text{M}$) reveal no significant differences in the absence (A) and in the presence (B) of Ca^{2+} . All distributions are normalized on the peak height. The Lamm equation modeling of SV data was performed using the SEDPHAT software package (27, 28). Data without Ca^{2+} (A) and with 10 mM Ca^{2+} (B) were fitted using the model, $\text{A} + \text{B} \rightleftharpoons \text{AB}$. Bmh1 was modeled as a tight dimer that interacts with pNth1 in 1:1 stoichiometry. Both series can be fitted with nearly identical $K_D < 21 \text{ nM}$ with 95% confidence level (the best fitted value was 10 nM). Loading concentrations were slightly corrected in the fit (up to 10%).

tested. Peptides 102–110, 110–124, and 156–172 exhibit significantly slower deuteration in the presence of Ca^{2+} (compare *black* and *red* lines in Fig. 5A), with the peptide 110–124 (which contains the EF-hand-like motif) showing the slower isotope exchange only in short incubation times. In addition, an even more profound decrease in the rate of deuteration was observed for all pNth1 peptides between residues 102 and 185 in the presence of Bmh1 (*blue* line) or Bmh1 + Ca^{2+} (*green* line). Observed changes in HDX kinetics might reflect additional conformational change and/or decreased accessibility to the solvent. Interestingly, only the peptide 110–124 showed significant differences in isotope exchange kinetics when comparing peptides from the pNth1·Bmh1 complex with or without Ca^{2+} . These results suggest that the region 102–185 of pNth1, espe-

cially the peptide 110–124 (the EF-hand like motif), adopts three different structural states (and/or positions) in the presence of Ca^{2+} , Bmh1, and Bmh1 + Ca^{2+} .

Structural Changes within the Catalytic Trehalase Domain of pNth1—Exchange kinetics for four peptides from the vicinity of the pNth1 active site whose deuteration was moderately but significantly decreased upon the Bmh1 protein binding is shown in Fig. 5B (20). It can be noticed that only the peptide 665–698 showed some decrease in the deuteration kinetics in the presence of Ca^{2+} (compare *black* and *red* lines). In addition, the presence of Ca^{2+} had no significant effect on isotope exchange kinetics of these four peptides in the presence of Bmh1 (compare *blue* and *green* lines).

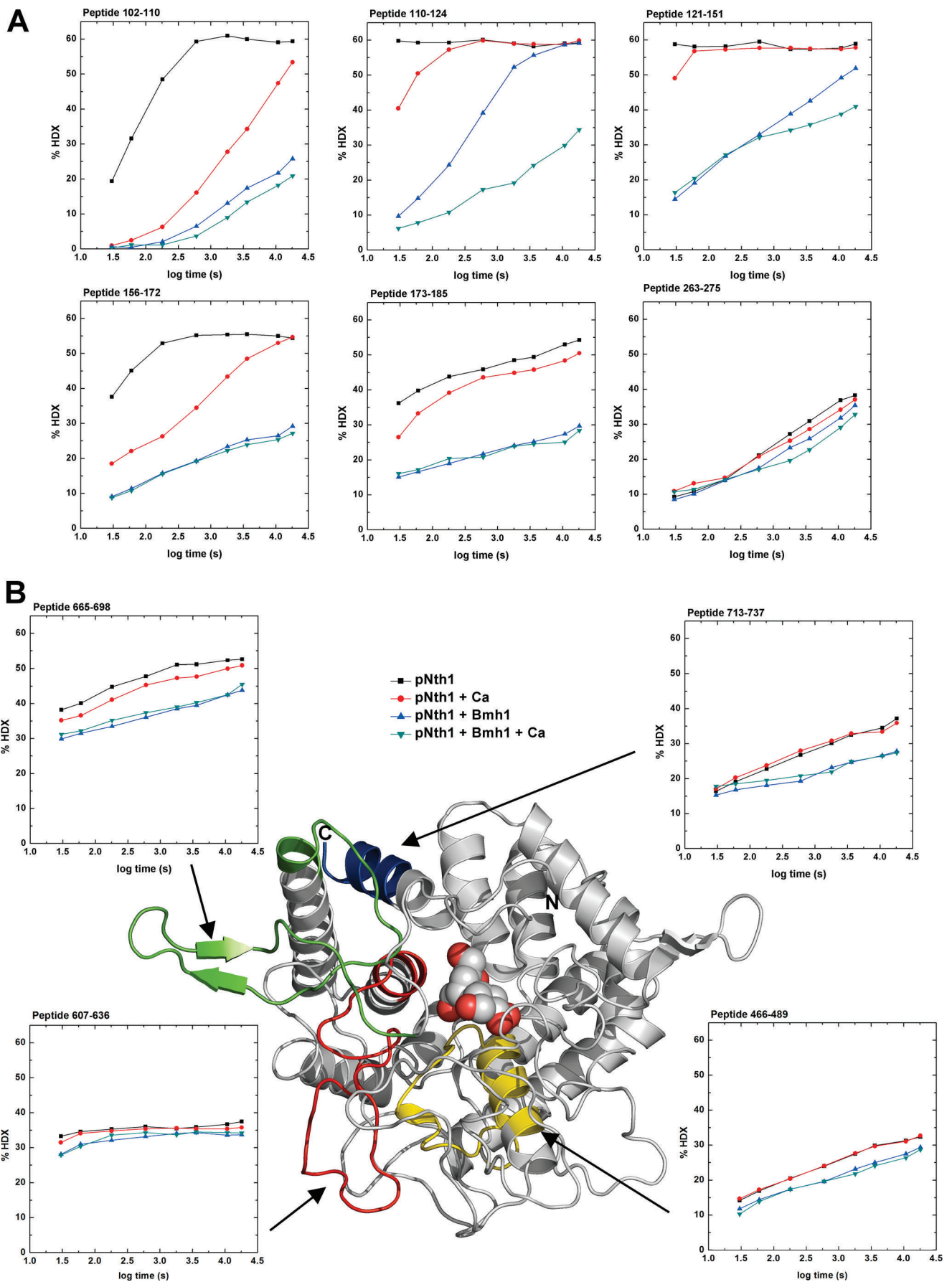
Thus, HDX-MS data suggested that the Ca^{2+} binding affects mainly the structure of the EF-hand-like motif-containing region, whereas its effect on the catalytic domain is less profound.

Ca^{2+} -mediated Structural Changes of Bmh1 Molecule—We also investigated whether the presence of Ca^{2+} affects the deuterium exchange kinetics of Bmh1 peptides. A significant decrease in the deuteration level in the presence of Ca^{2+} was observed for several peptides, with the strongest effect being observed for helices H3 (peptides 39–47 and 48–61), H8 (peptide 184–207), and H9 (peptide 227–232) (compare *black* and *red* lines in Fig. 6). Only two peptides (184–207 and 222–232 from helices H8 and H9, respectively) showed significantly decreased exchange kinetics when comparing peptides from the pNth1·Bmh1 complex with or without Ca^{2+} (compare *green* and *blue* lines in Fig. 6), suggesting that these helices might interact with and thus be affected by changes within the EF-hand-like motif of bound pNth1.

Binding to Bmh1 Affects the Relative Position of the N-terminal Region and the Catalytic Domain of pNth1—Site-directed mutagenesis and HDX-MS suggested that the structural integrity of the EF-hand-like motif is crucial for pNth1 activation and that its conformational change is an integral part of the activation process. This also implied that this region might be adjacent to the catalytic domain and that its conformational changes affect the structure (or the accessibility) of the active site and hence enable the activation. The crystallographic structural data are available only for trehalase Tre37A from *E. coli* (40) which shows homology with the catalytic domain of *S. cerevisiae* Nth1 (sequence 295–721). We used this homology to build a structural model of the catalytic domain of Nth1, which, however, does not include either the region containing the EF-hand like motif or the N-terminal segment containing PKA phosphorylation sites (and the 14-3-3 protein-binding motifs) (20). Therefore, we used chemical cross-linking combined with mass spectrometry and SAXS to obtain structural information concerning the relative position of the region containing the EF-hand-like motif and the catalytic domain as well as additional information about structural changes induced by Ca^{2+} and the 14-3-3 protein binding.

To enable easier distinction of changes induced by Ca^{2+} , both pNth1 alone and the pNth1·Bmh1 complex were cross-linked by non-deuterated cross-linking agents (DSS and DSG) in the presence of Ca^{2+} and by four-times deuterated agents in

Low Resolution Structure of the Bmh1·pNth1 Complex



the absence of Ca^{2+} (see “Experimental Procedures” for details). The cross-linking experiments with pNth1 alone revealed 33 intramolecular distance constraints (Table 2), from which 17 can be compared with $C\alpha$ – $C\alpha$ distance constraints derived from the homology model of the catalytic domain (data not shown). No cross-links between the N-terminal region (sequence 1–250) and the catalytic domain (sequence 300–720) were observed, suggesting that in the absence of Bmh1, these two domains are not in contact with one another. Quantification of obtained cross-links (last two columns in Table 2) revealed that the ratio between non-deuterated and deuterated cross-links is close to 1:1 for all but two of them. The two exceptions are for the peptide from the region containing the EF-hand like motif whose residues Lys-132 and Lys-142 are cross-linked only in the presence of Ca^{2+} (the abundances of DSG and DSS cross-links are ~ 78 and $\sim 90\%$, respectively). This suggests that in the presence of Ca^{2+} , these two lysines are close enough to form a cross-link. However, in the absence of Ca^{2+} , this region possesses different conformation and/or flexibility, and the distance between these two residues is too large to form a cross-link.

The list of pNth1 cross-links from the pNth1·Bmh1 complex is shown in Table 3. In this case, the presence of Ca^{2+} changed the abundances of significantly more cross-links compared with pNth1 alone. This confirmed that pNth1 (when bound to Bmh1) adopts a different conformation that is more sensitive to Ca^{2+} binding compared with free pNth1. The most profound changes were observed for intramolecular cross-links Lys²¹¹–Lys²¹⁴, Lys²¹⁴–Lys⁵⁶³, Lys²⁵⁷–Lys²⁵⁸, Lys²⁵⁸–Lys³⁹³, Lys³⁸⁵–Lys⁵¹⁷, Lys⁴⁵⁶–Lys⁴⁵⁸, and Lys⁵⁸⁹–Lys⁵⁹³. The presence of the cross-link Lys²¹⁴–Lys⁵⁶³, which was not observed for pNth1 alone, suggested that the part containing residue Lys²¹⁴ and the catalytic domain (containing Lys⁵⁶³) of pNth1 are much closer to one another in the Bmh1-bound form. In addition, the differences between conformations of pNth1 bound to Bmh1 in the presence and the absence of Ca^{2+} are also supported by intermolecular cross-links between pNth1 and Bmh1 peptides (Table 4). Although in the presence of Ca^{2+} the intramolecular cross-link between pNth1 residues Lys²¹⁴ and Lys⁵⁶³ is preferentially formed (Table 3), in the absence of Ca^{2+} , these two residues preferentially form intermolecular cross-links with Bmh1 residues Lys¹²⁷ and Lys⁷⁶, respectively (Table 4). A similar effect was also observed for pNth1 residue Lys³⁹³, which forms in the presence of a Ca^{2+} intramolecular cross-link with Lys²⁵⁸, whereas in the absence of Ca^{2+} , prefers an intermolecular cross-link with Bmh1 residue Lys¹⁴⁵ (Tables 3 and 4). The results of chemical cross-linking for the Bmh1 alone correspond well with the distance restraints derived from the homology model of the Bmh1 molecule (data not shown).

Low Resolution Structure of the pNth1·Bmh1 Protein Complex—SAXS offers information about the dimension and shape of a protein in solution and was thus used here to gain visual insight into the global architecture of Nth1, Bmh1, and their complex. The experimental SAXS curves from Nth1, Bmh1, and the pNth1·Bmh1 complex are shown in Fig. 7A. The apparent molecular mass of the pNth1·Bmh1 protein complex was estimated by comparison of the forward scattering intensity $I(0)$ with that from reference solutions of bovine serum albumin. The estimated molecular mass of ~ 147 kDa corresponds well to 2:1 molar stoichiometry, in good agreement with our previously published results (15). The Guinier analysis revealed that Nth1 alone has a significantly larger radius of gyration (R_g of 52.0 ± 0.4 Å) compared with Bmh1 alone (R_g of 32.6 ± 0.1 Å) and the pNth1·Bmh1 complex (R_g of 40.5 ± 0.1 Å), suggesting that the complex is a more compact particle than Nth1 alone.

This was further confirmed by the distance distribution function, $P(r)$, which revealed maximal dimensions (D_{max}) of Bmh1, Nth1, and the pNth1·Bmh1 complex to be of 92, 183, and 127 Å, respectively (Fig. 7B). These values of D_{max} corroborated a more extended and asymmetric shape of free Nth1 compared with the complex.

The calculated low resolution *ab initio* envelopes for Nth1 alone, Bmh1 alone, and the pNth1·Bmh1 complex are shown in Fig. 7, C–E. The envelope of Bmh1 alone shows a characteristic cuplike shape of the 14-3-3 dimer molecule and agrees well with the theoretical model of Bmh1 dimer (Fig. 7C). The envelope for Nth1 alone (Fig. 7D) shows that the enzyme adopts an extended rodlike conformation, in good agreement with the results of cross-linking experiments, where no cross-links between the N-terminal region and the catalytic domain were observed (Table 2). The narrower half probably represents the flexible and unstructured N-terminal segment containing all PKA phosphorylation sites and the 14-3-3-binding motifs, whereas the thicker half would correspond to the rest of the enzyme (the EF-hand like motif-containing region and the catalytic domain).

The envelope of the complex is, as expected, more spherical and shows that pNth1 adopts significantly different conformation when bound to Bmh1 (Fig. 7E). The shape of the envelope suggests that the cuplike-shaped Bmh1 dimer is located within the wide central part of the particle. The rigid body modeling of the pNth1·Bmh1 complex was performed using homology models of Bmh1 and the catalytic domain of Nth1 (sequence 295–721). The rigid body model of the Nth1(295–721)·Bmh1 complex displayed good agreement with both the low resolution molecular envelope and the results of cross-linking experiments (Table 4). The *inset* in Fig. 7E shows the detailed view of the binding interface between Nth1(295–721) and Bmh1, where two of three observed intermolecular cross-links

FIGURE 5. HDX-MS reveals conformational changes of pNth1 upon the Ca^{2+} binding. Graphs represent HDX kinetics for selected pNth1 regions that show different deuterium exchange kinetics in the presence of Ca^{2+} , Bmh1, and Bmh1 + Ca^{2+} (for the sake of comparison, these figures also show previously published data obtained in the absence of Ca^{2+} for pNth1 alone and when bound to Bmh1 (20)). *A*, peptides from the N-terminal part of Nth1 that are missing in the homology model of the catalytic domain. *B*, peptides from the catalytic trehalase domain (shown in yellow, red, green, and blue) are mapped on its homology structural model covering the sequence 295–721. Deuterium exchange is expressed as percentages relative to the maximum theoretical deuteration level for pNth1 alone (black squares), pNth1 in the presence of Ca^{2+} (red circles), pNth1 in the presence of Bmh1 (blue triangles), and pNth1 in the presence of Bmh1 + Ca^{2+} (green triangles). Time units are in seconds.

Low Resolution Structure of the Bmh1-pNth1 Complex

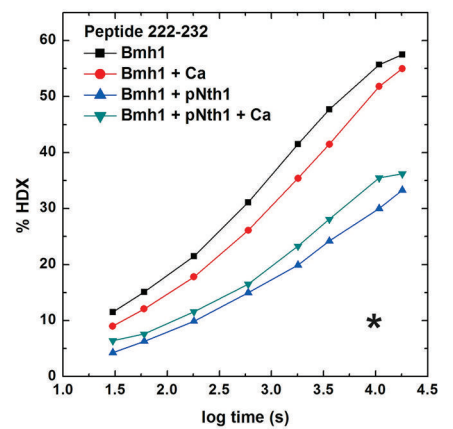
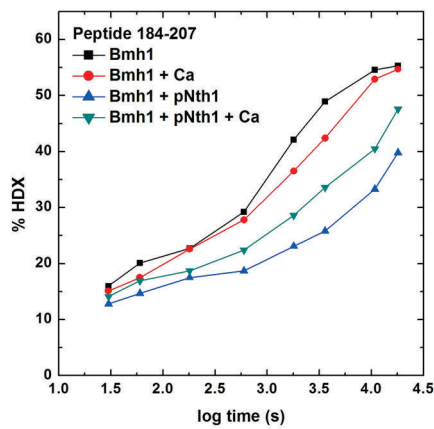
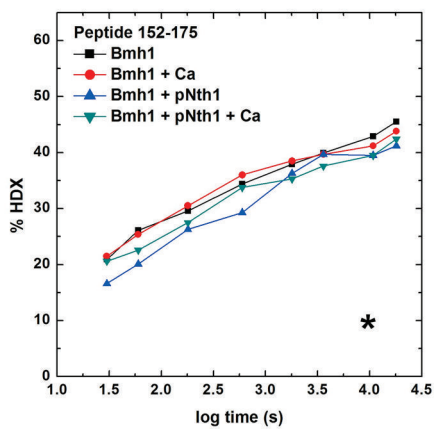
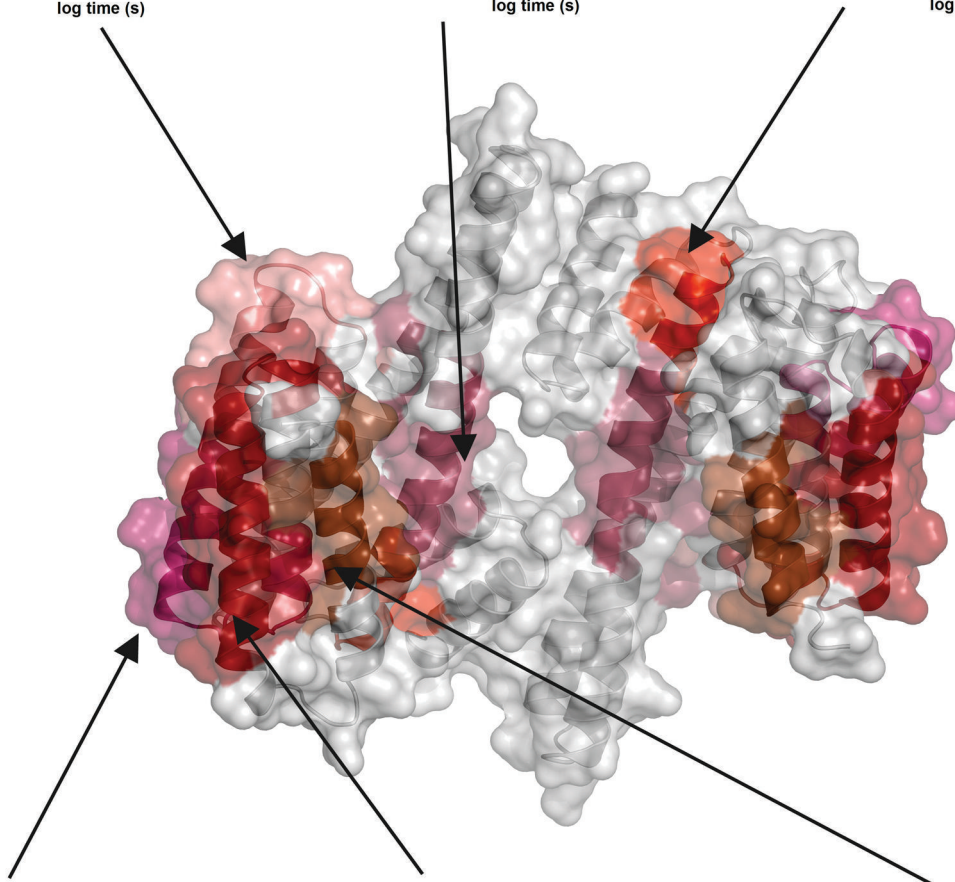
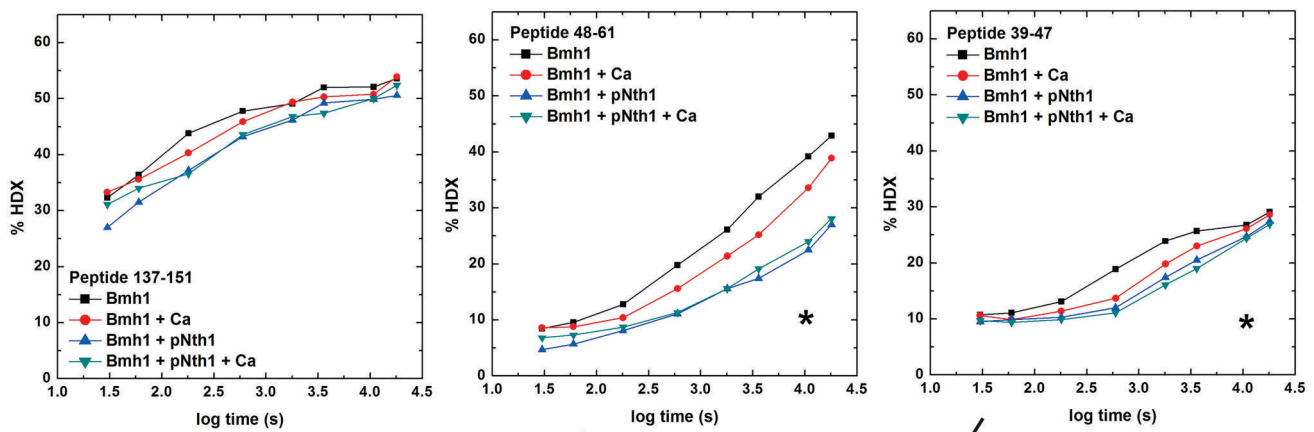


TABLE 2

Intramolecular distance constraints of pNth1 derived from the cross-linking experiments in the presence and the absence of Ca²⁺ and their comparison with distance constraints derived from the homology model of the catalytic domain of Nth1

Cross-linker	Cross-linked residues	Cα-Cα distance from the homology model Å	Cα-Cα distance constraint from the cross-linking experiments ^a Å	pNth1 (DSS(G)/DSS(G)D4) ^b	
				+Ca ²⁺ %	-Ca ²⁺ %
DSG/DSGD4	Lys ⁴⁹ -Lys ⁵⁸⁴		≤20	49.8	50.2
DSG/DSGD4	Lys ⁴⁹ -Lys ⁶⁹		≤20	55.7	44.3
DSS/DSSD4	Lys ⁵² -Lys ¹⁰⁴		≤24	42.2	57.8
DSS/DSSD4	Lys ⁵² -Lys ⁵⁸⁴		≤24	48.4	51.6
DSG/DSGD4	Lys ⁷⁰ -Lys ⁷⁵		≤20	45.1	54.9
DSS/DSSD4	Lys ⁷⁰ -Lys ⁷⁵		≤24	53.4	46.6
DSG/DSGD4	Lys ¹³² -Lys ¹⁴²		≤20	77.6	22.4
DSS/DSSD4	Lys ¹³² -Lys ¹⁴²		≤24	89.8	10.2
DSG/DSGD4	Lys ²¹¹ -Lys ²¹⁴		≤20	51	49
DSS/DSSD4	Lys ²¹¹ -Lys ²¹⁴		≤24	45.4	54.6
DSG/DSGD4	Lys ²⁵⁷ -Lys ²⁵⁸		≤20	47	53
DSS/DSSD4	Lys ²⁵⁷ -Lys ²⁵⁸		≤24	50.3	49.7
DSG/DSGD4	Lys ²⁵⁸ -Lys ³⁴³		≤20	47.8	52.2
DSS/DSSD4	Lys ²⁵⁸ -Lys ³⁴³		≤24	55.6	44.4
DSG/DSGD4	Lys ²⁵⁸ -Lys ³⁹³		≤20	51	49
DSS/DSSD4	Lys ²⁵⁸ -Lys ³⁹³		≤24	51.3	48.7
DSG/DSGD4	Lys ³⁷⁰ -Lys ³⁷¹	3.9	≤20	49.7	50.3
DSS/DSSD4	Lys ³⁷⁰ -Lys ³⁷¹	3.9	≤24	45.4	54.6
DSG/DSGD4	Lys ³⁷¹ -Lys ⁷¹⁸	17.7	≤20	50.1	49.9
DSS/DSSD4	Lys ³⁷¹ -Lys ⁷¹⁸	17.7	≤24	48.9	51.1
DSG/DSGD4	Lys ³⁸⁵ -Lys ⁵¹⁷	17.5	≤20	48.8	51.2
DSS/DSSD4	Lys ³⁸⁵ -Lys ⁵¹⁷	17.5	≤24	45.5	54.5
DSG/DSGD4	Lys ⁴⁵⁶ -Lys ⁴⁵⁸	6.5	≤20	46.4	53.6
DSS/DSSD4	Lys ⁴⁵⁶ -Lys ⁴⁵⁸	6.5	≤24	51.4	48.6
DSS/DSSD4	Lys ⁴⁵⁸ -Lys ⁴⁶¹	7.6	≤24	41.3	58.7
DSG/DSGD4	Lys ⁴⁶¹ -Lys ⁵⁶¹	16.4	≤20	48.1	51.9
DSS/DSSD4	Lys ⁴⁶¹ -Lys ⁵⁶¹	16.4	≤24	48.8	51.2
DSS/DSSD4	Lys ⁵³⁷ -Lys ⁵⁸⁴	16.4	≤24	44.9	55.1
DSG/DSGD4	Lys ⁵⁶¹ -Lys ⁵⁶³	5.6	≤20	52.4	47.6
DSG/DSGD4	Lys ⁵⁸⁹ -Lys ⁵⁹³	6.1	≤20	46.2	53.8
DSS/DSSD4	Lys ⁵⁸⁹ -Lys ⁵⁹³	6.1	≤24	46.9	53.1
DSG/DSGD4	Lys ⁵⁹³ -Lys ⁵⁹⁷	6.3	≤20	46.9	53.1
DSS/DSSD4	Lys ⁵⁹³ -Lys ⁵⁹⁷	6.3	≤24	47.7	52.3

^a The Cα-Cα interresidue distance constraints used were based on the length of the spacer arm, which is 7.7 Å for DSG and 11.4 Å for DSS. Concerning the flexibility of the lysine side chains, the following cut-offs are generally used: 20 Å for α-carbons of lysine cross-linked with DSG and 24 Å for α-carbons of lysine cross-linked with DSS (30).

^b Representation (%) of individual cross-link isoform (the ratio between the abundance of non-deuterated and deuterated cross-links). pNth1 was cross-linked by non-deuterated cross-linking agents (DSS and DSG) in the presence of Ca²⁺ and by four-times deuterated agents in the absence of Ca²⁺.

(Lys⁷⁶(Bmh1)-Lys⁵⁶³(Nth1) and Lys¹⁴⁵(Bmh1)-Lys³⁹³(Nth1)) are located. The third intermolecular cross-link (Lys¹²⁷(Bmh1)-Lys²¹⁴(Nth1)) involves Nth1 residue Lys²¹⁴ outside of the modeled catalytic domain. The molecular envelope also suggested locations of the N-terminal segment and the EF-hand like motif-containing region of pNth1. The central part of the envelope is significantly wider than the maximum width of the Bmh1 dimer envelope and more bulky on one side just next to α-helices H5, H6, and H8 of Bmh1 and close to the catalytic domain of Nth1. We believe that this bulky part represents the EF-hand-like motif-containing region of pNth1. Peptides from α-helices H6, H8, and H9 of Bmh1 showed significantly decreased exchange kinetics and the highest sensitivity to the presence of Ca²⁺ upon the binding of pNth1 (Fig. 6). In addition, the intermolecular cross-link Lys¹²⁷(Bmh1)-Lys²¹⁴(Nth1) connects residues Lys¹²⁷ from the α-helix H5 of Bmh1 and Lys²¹⁴ from the EF-hand-like motif-containing region of Nth1 (Table 4). Thus, these data suggested that the EF-hand-like motif-containing region of pNth1 forms a sepa-

rate domain that interacts with both the outer surface of the Bmh1 dimer (outside its central channel involving helices H5, H6, H8, and H9) and the catalytic trehalase domain.

The narrow protrusion located just in front of one ligand binding groove of Bmh1 probably represents the very N-terminal segment of pNth1, whereas the rest of the N-terminal part, which contains both phosphorylated 14-3-3 binding motifs (Ser(P)⁶⁰ and Ser(P)⁸³; Fig. 1A), would be docked within the ligand binding grooves of the Bmh1 molecule, as has been observed in other structures of the 14-3-3 protein complexes (41–45).

DISCUSSION

The helix-loop-helix EF-hand Ca²⁺-binding motif is a widespread and versatile sequence found in a large number of protein families (36, 37). The N-terminal part of *S. cerevisiae* contains sequence that closely resembles such an EF-hand motif (Fig. 1), suggesting the possibility that this sequence and the calcium binding play a role in the regulation of this enzyme activity (13). In this work, various techniques of structural biology, including HDX-

FIGURE 6. HDX-MS reveals regions of Bmh1 that are affected by Ca²⁺ and pNth1 binding. HDX kinetics for Bmh1 regions that show slower deuterium exchange kinetics upon pNth1 binding mapped on the surface representation of the structural model of Bmh1 dimer (shown in different shades of red). For the sake of comparison, these figures also show previously published data obtained in the absence of Ca²⁺ for Bmh1 alone and when bound to pNth1 (20). Deuterium exchange is expressed as percentages relative to the maximum theoretical deuteration level for Bmh1 alone (black squares), Bmh1 in the presence of Ca²⁺ (red circles), Bmh1 in the presence of pNth1 (green triangles), and Bmh1 in the presence of pNth1 + Ca²⁺ (blue triangles). Time units are in seconds. Peptides forming the ligand binding groove are marked with an asterisk.

Low Resolution Structure of the Bmh1·pNth1 Complex

TABLE 3

Intramolecular distance constraints of pNth1 bound to Bmh1 derived from the cross-linking experiments in the presence and the absence of Ca²⁺ and their comparison with distance constraints derived from the homology model of the catalytic domain of Nth1

Cross-linker	Cross-linked residues	Cα–Cα distance from the homology model Å	Cα–Cα distance constraint from the cross-linking experiments ^a Å	pNth1 (DSS(G)/DSS(G)D4) ^b	
				+Ca ²⁺ %	–Ca ²⁺ %
DSG/DSGD4	Lys ⁷⁰ –Lys ⁷⁵		≤20	55.5	44.5
DSS/DSSD4	Lys ⁷⁰ –Lys ⁷⁵		≤24	49.0	51.0
DSG/DSGD4	Lys ¹³² –Lys ¹⁴²		≤20	56.8	43.2
DSS/DSSD4	Lys ¹³² –Lys ¹⁴²		≤24	52.9	47.1
DSG/DSGD4	Lys ²¹¹ –Lys ²¹⁴		≤20	65.3	34.7
DSS/DSSD4	Lys ²¹¹ –Lys ²¹⁴		≤24	58.8	41.2
DSG/DSGD4	Lys ²¹⁴ –Lys ⁵⁶³		≤20	80.0	20
DSS/DSSD4	Lys ²¹⁴ –Lys ⁵⁶³		≤24	60.1	39.9
DSG/DSGD4	Lys ²⁵⁷ –Lys ²⁵⁸		≤20	66.7	33.3
DSS/DSSD4	Lys ²⁵⁷ –Lys ²⁵⁸		≤24	59.3	40.7
DSG/DSGD4	Lys ²⁵⁸ –Lys ³⁹³		≤20	68.3	31.7
DSS/DSSD4	Lys ²⁵⁸ –Lys ³⁹³		≤24	71.2	28.8
DSG/DSGD4	Lys ³⁷⁰ –Lys ³⁷¹	3.9	≤20	54.9	45.1
DSS/DSSD4	Lys ³⁷⁰ –Lys ³⁷¹	3.9	≤24	47.9	52.1
DSG/DSGD4	Lys ³⁸⁵ –Lys ⁵¹⁷	17.5	≤20	70.2	29.8
DSS/DSSD4	Lys ³⁸⁵ –Lys ⁵¹⁷	17.5	≤24	50.8	49.2
DSG/DSGD4	Lys ³⁹³ –Lys ³⁹⁶	5.1	≤20	51.1	48.9
DSS/DSSD4	Lys ³⁹³ –Lys ³⁹⁶	5.1	≤24	49.5	50.5
DSG/DSGD4	Lys ⁴⁵⁶ –Lys ⁴⁵⁸	6.5	≤20	68.8	31.2
DSS/DSSD4	Lys ⁴⁵⁶ –Lys ⁴⁵⁸	6.5	≤24	63.7	36.3
DSG/DSGD4	Lys ⁴⁵⁸ –Lys ⁴⁶¹	7.6	≤24	50.2	49.8
DSS/DSSD4	Lys ⁴⁵⁸ –Lys ⁴⁶¹	7.6	≤24	51.1	48.9
DSG/DSGD4	Lys ⁵³⁷ –Lys ⁵⁸⁴	16.4	≤24	71.1	28.9
DSS/DSSD4	Lys ⁵³⁷ –Lys ⁵⁸⁴	16.4	≤24	51.1	48.9
DSG/DSGD4	Lys ⁵⁸⁹ –Lys ⁵⁹³	6.1	≤20	71.1	28.9
DSS/DSSD4	Lys ⁵⁸⁹ –Lys ⁵⁹³	6.1	≤24	55.1	44.9

^a The Cα–Cα interresidue distance constraints used were based on the length of the spacer arm, which is 7.7 Å for DSG and 11.4 Å for DSS. Concerning the flexibility of the lysine side chains, the following cut-offs are generally used: 20 Å for α-carbons of lysine cross-linked with DSG and 24 Å for α-carbons of lysine cross-linked with DSS (30).

^b Representation (%) of individual cross-link isoform (the ratio between the abundance of non-deuterated and deuterated cross-links). pNth1 bound to Bmh1 was cross-linked by non-deuterated cross-linking agents (DSS and DSG) in the presence of Ca²⁺ and by four-times deuterated agents in the absence of Ca²⁺.

TABLE 4

Intermolecular distance constraints between pNth1 and Bmh1 derived from the cross-linking experiments in the presence and the absence of Ca²⁺

Cross-linker	Cross-linked residues	Cα–Cα distance constraint from the cross-linking experiments ^a Å	Bmh1·pNth1 (DSS(G)/DSS(G)D4) ^b	
			+Ca ²⁺ %	–Ca ²⁺ %
DSG/DSGD4	Lys ^{127a} –Lys ^{214b}	≤20	28.8	71.2
DSS/DSSD4	Lys ^{127a} –Lys ^{214b}	≤24	40.2	59.8
DSG/DSGD4	Lys ^{76a} –Lys ^{563b}	≤20	34.7	65.3
DSS/DSSD4	Lys ^{76a} –Lys ^{563b}	≤24	42.2	57.8
DSG/DSGD4	Lys ^{145a} –Lys ^{393b}	≤20	31.3	68.7
DSS/DSSD4	Lys ^{145a} –Lys ^{393b}	≤24	30.7	69.3

^a The Cα–Cα interresidue distance constraints used were based on the length of the spacer arm, which is 7.7 Å for DSG and 11.4 Å for DSS. Concerning the flexibility of the lysine side chains, the following cut-offs are generally used: 20 Å for α-carbons of lysine cross-linked with DSG and 24 Å for α-carbons of lysine cross-linked with DSS (30).

^b Representation (%) of individual cross-link isoform (the ratio between the abundance of non-deuterated and deuterated cross-links). The pNth1·Bmh1 complex was cross-linked by non-deuterated cross-linking agents (DSS and DSG) in the presence of Ca²⁺ and by four-times deuterated agents in the absence of Ca²⁺.

^c Residues from the Bmh1 peptide.

^d Residues from the pNth1 peptide.

MS, chemical cross-linking, and SAXS, were used to investigate the mechanism of the 14-3-3 protein-mediated activation of Nth1 and, especially, the role of EF-hand like motif in this process.

Site-directed mutagenesis of residues located at important positions within the EF-hand like motif significantly affected the Bmh1-mediated activation of pNth1 (Fig. 2B, *white bars*), thus suggesting the essential role of this region in the activation process. This is in a good agreement with our previous HDX-MS experiments that revealed significant 14-3-3 protein-mediated structural changes not only within the catalytic trehalase domain but mainly

in this region (20). Interestingly, the presence of Ca²⁺ recovered the Bmh1-mediated trehalase activity of most of the studied mutants (Fig. 2B, *gray bars*), with the exception of those where we mutated conserved positions 1, 5, and 12 of the EF-hand motif (mutants D114L, N118L, and D125L) that are directly involved in metal coordination (36, 37). The inability of the D114L and D125L mutants to become activated was not due to the lack of the Bmh1-mediated structural change, as documented by near-UV CD spectra (Fig. 3), but rather resulted from different conformation of the EF-hand like motif. In support of that, Ca²⁺-binding rescue mutants D114E and D125E showed high Bmh1-mediated activity but only in the presence of Ca²⁺. These data suggested that the calcium binding to the EF-hand like motif facilitates the 14-3-3 protein-mediated activation of pNth1 because it enabled activation of mutants that are catalytically inactive in the absence of Ca²⁺.

The key role of the EF-hand like motif-containing region in the activation of pNth1 was further confirmed by results obtained from HDX-MS and chemical cross-linking. These experiments showed that this region adopts different conformational states depending on the presence of Ca²⁺, Bmh1, or both (Fig. 5 and Tables 2–4). We suggest that these different structural states are reflected by different trehalase activities under these conditions. Consistently, the comparison of SAXS-based low resolution molecular envelopes of both Nth1 alone and the pNth1·Bmh1 complex (Fig. 7, D and 7E) revealed a dramatic structural change of pNth1 upon its binding to Bmh1. The low resolution *ab initio* shape of the pNth1·Bmh1 complex also suggested that the EF-hand-like-containing region of Nth1 forms a separate domain that interacts with both the outer surface of the Bmh1 dimer and the

Low Resolution Structure of the Bmh1-pNth1 Complex

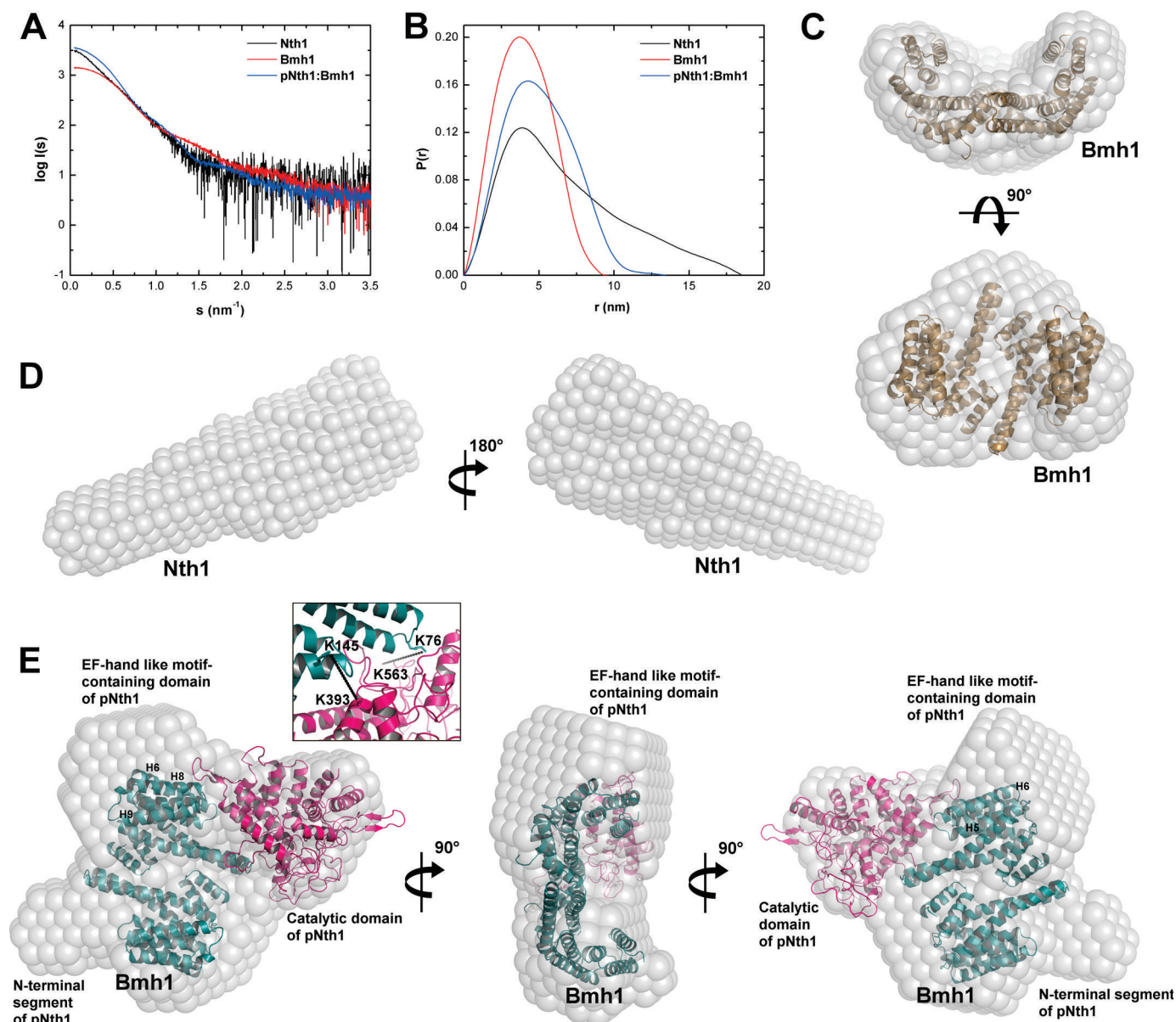


FIGURE 7. SAXS scattering data and the low resolution structure of Nth1, Bmh1, and pNth1-Bmh1 complex. *A*, solution scattering pattern for Nth1, Bmh1, and the pNth1-Bmh1 complex. Scattering intensity $I(s)$ is plotted in relation to the scattering vector s ($s = 4\pi\sin(\theta)/\lambda$, where 2θ is the scattering angle and λ is the wavelength). *B*, plot of the distance distribution functions $P(r)$ with the maximum particle dimensions (D_{\max}) of 92, 183, and 127 Å for Bmh1, Nth1, and the pNth1-Bmh1 complex, respectively. *C*, superposition of the SAXS-based envelope (spheres represent the dummy residues) of Bmh1 with the theoretical model of Bmh1 (sequence 4–236). *D*, SAXS-based envelope of Nth1 alone. *E*, overlay of the rigid body model of the Nth1(295–721)-Bmh1 complex with SAXS-based envelope. The envelope is shown in gray, the catalytic domain of Nth1 (sequence 295–721) is shown in magenta, and Bmh1 dimer (sequence 4–236) is shown in cyan. A rigid body model was prepared using homology models of the catalytic domain of Nth1 (295–721) and Bmh1 (20). The inset shows the binding interface between Nth1 (295–721) and Bmh1, where two of three observed intermolecular cross-links (Lys⁷⁶(Bmh1)–Lys⁵⁶³(Nth1) and Lys¹⁴⁵(Bmh1)–Lys³⁹³(Nth1)) are located.

catalytic trehalase domain, thus supporting our hypothesis that the conformation of this region modulates the 14-3-3-mediated structural changes within the catalytic trehalase domain and thus the resulting enzyme activity.

Therefore, based on our data, we suggest the following model of Nth1 activation. In the absence of the 14-3-3 protein, Nth1 adopts an extended rodlike conformation, and the trehalase activity is very small, probably as a result of the inaccessibility of the active site, as shown by the crystal structure of the homologous domain of the trehalase Tre37A from *E. coli* (Fig. 5B) (40). The 14-3-3 protein binding to the phosphorylated N-terminal segment of pNth1 induces a significant structural

rearrangement of the whole Nth1 molecule. This conformational change probably increases the accessibility of the active site and thus activates the enzyme. The EF-hand-like motif-containing region forms a separate domain that interacts with both the 14-3-3 protein and the catalytic trehalase domain. The structural integrity of the EF-hand like motif is essential for the 14-3-3 protein-mediated activation of Nth1, and calcium binding, although not required for the activation, facilitates this process by affecting its structure. Our data suggest that the EF-hand-like motif-containing domain functions as the intermediary through which the 14-3-3 protein modulates the function of the catalytic domain of Nth1.

Low Resolution Structure of the Bmh1-pNth1 Complex

Acknowledgments—We thank P. Novotna and M. Urbanova (Institute of Chemical Technology, Prague) for measuring the CD spectra and J. Pisackova (Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic v.v.i.) for help with the thermofluor method.

REFERENCES

1. Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I., and Carroll, D. (2003) New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* **13**, 17R–27R
2. Nwaka, S., and Holzer, H. (1998) Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **58**, 197–237
3. Kopp, M., Müller, H., and Holzer, H. (1993) Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **268**, 4766–4774
4. Becker, A., Schlöder, P., Steele, J. E., and Wegener, G. (1996) The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia* **52**, 433–439
5. Behm, C. A. (1997) The role of trehalose in the physiology of nematodes. *Int. J. Parasitol.* **27**, 215–229
6. Oesterreicher, T. J., Markesich, D. C., and Henning, S. J. (2001) Cloning, characterization and mapping of the mouse trehalase (Treh) gene. *Gene* **270**, 211–220
7. Alizadeh, P., and Klionsky, D. J. (1996) Purification and biochemical characterization of the ATH1 gene product, vacuolar acid trehalase, from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **391**, 273–278
8. Amaral, F. C., Van Dijck, P., Nicoli, J. R., and Thevelein, J. M. (1997) Molecular cloning of the neutral trehalase gene from *Kluyveromyces lactis* and the distinction between neutral and acid trehalases. *Arch. Microbiol.* **167**, 202–208
9. Nwaka, S., Mechler, B., Destruelle, M., and Holzer, H. (1995) Phenotypic features of trehalase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **360**, 286–290
10. Jules, M., Beltran, G., François, J., and Parrou, J. L. (2008) New insights into trehalose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*: NTH2 encodes a functional cytosolic trehalase, and deletion of TPS1 reveals Ath1p-dependent trehalose mobilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 605–614
11. Uno, I., Matsumoto, K., Adachi, K., and Ishikawa, T. (1983) Genetic and biochemical evidence that trehalase is a substrate of cAMP-dependent protein kinase in yeast. *J. Biol. Chem.* **258**, 10867–10872
12. Ortiz, C. H., Maia, J. C., Tenan, M. N., Braz-Padrão, G. R., Mattoon, J. R., and Panek, A. D. (1983) Regulation of yeast trehalase by a monocyclic, cyclic AMP-dependent phosphorylation-dephosphorylation cascade system. *J. Bacteriol.* **153**, 644–651
13. Franco, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Paredes, V., Madrid, M., Gacto, M., and Cansado, J. (2003) A role for calcium in the regulation of neutral trehalase activity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. J.* **376**, 209–217
14. Panni, S., Landgraf, C., Volkmer-Engert, R., Cesareni, G., and Castagnoli, L. (2008) Role of 14-3-3 proteins in the regulation of neutral trehalase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **8**, 53–63
15. Veisova, D., Macakova, E., Rezabkova, L., Sulc, M., Vacha, P., Sychrova, H., Obsil, T., and 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
16. Schepers, W., Van Zeebroeck, G., Pinkse, M., Verhaert, P., and Thevelein, J. M. (2012) *In vivo* phosphorylation of Ser²¹ and Ser⁸³ during nutrient-induced activation of the yeast protein kinase A (PKA) target trehalase. *J. Biol. Chem.* **287**, 44130–44142
17. van Heusden, G. P., Griffiths, D. J., Ford, J. C., Chin-A-Woeng, T. F., Schrader, P. A., Carr, A. M., and Steensma, H. Y. (1995) The 14-3-3 proteins encoded by the BMH1 and BMH2 genes are essential in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and can be replaced by a plant homologue. *Eur. J. Biochem.* **229**, 45–53
18. van Heusden, G. P. (2009) 14-3-3 proteins: insights from genome-wide studies in yeast. *Genomics* **94**, 287–293
19. Mackintosh, C. (2004) Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. *Biochem. J.* **381**, 329–342
20. Macakova, E., Kopecka, M., Kukacka, Z., Veisova, D., Novak, P., Man, P., Obsil, T., and Obsilova, V. (2013) Structural basis of the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 4491–4499
21. Veisova, D., Rezabkova, L., Stepanek, M., Novotna, P., Herman, P., Vecer, J., Obsil, T., and 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
22. Goodwin, T. W., and Morton, R. A. (1946) The spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophan in proteins. *Biochem. J.* **40**, 628–632
23. Niesen, F. H., Berglund, H., and Vedadi, M. (2007) The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat. Protoc.* **2**, 2212–2221
24. Pisackova, J., Prochazkova, K., Fabry, M., and Rezacova, P. (2012) Crystalization of the effector-binding domain of repressor DeoR from *Bacillus subtilis*. *Crystal Growth Des.* **13**, 844–848
25. Pernambuco, M. B., Winderickx, J., Crauwels, M., Griffioen, G., Mager, W. H., and Thevelein, J. M. (1996) Glucose-triggered signalling in *Saccharomyces cerevisiae*: different requirements for sugar phosphorylation between cells grown on glucose and those grown on non-fermentable carbon sources. *Microbiology* **142**, 1775–1782
26. Whitmore, L., and Wallace, B. A. (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res.* **32**, W668–W673
27. Schuck, P. (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling. *Biophys. J.* **78**, 1606–1619
28. Dam, J., Velikovskiy, C. A., Mariuzza, R. A., Urbanke, C., and Schuck, P. (2005) Sedimentation velocity analysis of heterogeneous protein-protein interactions: Lamm equation modeling and sedimentation coefficient distributions *c(s)*. *Biophys. J.* **89**, 619–634
29. Rezabkova, L., Man, P., Novak, P., Herman, P., Vecer, J., Obsilova, V., and 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
30. Young, M. M., Tang, N., Hempel, J. C., Oshiro, C. M., Taylor, E. W., Kuntz, I. D., Gibson, B. W., and Dollinger, G. (2000) High throughput protein fold identification by using experimental constraints derived from intramolecular cross-links and mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 5802–5806
31. Konarev, P. V., Volkov, V. V., Petoukhov, M. V., and Svergun, D. I. (2006) ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* **39**, 277–286
32. Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J., and Svergun, D. I. (2003) PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* **36**, 1277–1282
33. Svergun, D. I. (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Crystallogr.* **25**, 495–503
34. Svergun, D. I. (1999) Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys. J.* **76**, 2879–2886
35. Volkov, V. V., and Svergun, D. I. (2003) Uniqueness of *ab initio* shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Crystallogr.* **36**, 860–864
36. Rashidi, H. H., Bauer, M., Patterson, J., and Smith, D. W. (1999) Sequence motifs determine structure and Ca⁺⁺-binding by EF-hand proteins. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**, 175–182
37. Lewit-Bentley, A., and Réty, S. (2000) EF-hand calcium-binding proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 637–643
38. Engen, J. R. (2009) Analysis of protein conformation and dynamics by hydrogen/deuterium exchange MS. *Anal. Chem.* **81**, 7870–7875
39. Iacob, R. E., and Engen, J. R. (2012) Hydrogen exchange mass spectrometry: are we out of the quicksand? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **23**, 1003–1010
40. Gibson, R. P., Gloster, T. M., Roberts, S., Warren, R. A., Storch de Gracia, I., Garcia, A., Chiara, J. L., and Davies, G. J. (2007) Molecular basis for trehalase inhibition revealed by the structure of trehalase in complex with potent inhibitors. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* **46**, 4115–4119

Low Resolution Structure of the Bmh1-pNth1 Complex

41. Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L. C., Smerdon, S. J., Gamblin, S. J., and 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
42. Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S. J., Smerdon, S. J., and Cantley, L. C. (1997) The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* **91**, 961–971
43. Obsil, T., Ghirlando, R., Klein, D. C., Ganguly, S., and Dyda, F. (2001) Crystal structure of the 14-3-3 ζ :serotonin *N*-acetyltransferase complex. a role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell* **105**, 257–267
44. Ottmann, C., Marco, S., Jaspert, N., Marcon, C., Schauer, N., Weyand, M., Vandermeeren, C., Duby, G., Boutry, M., Wittinghofer, A., Rigaud, J. L., and 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
45. Yang, X., Lee, W. H., Sobott, F., Papagrigoriou, E., Robinson, C. V., Grossmann, J. G., Sundström, M., Doyle, D. A., and 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
46. Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M. Y., Pieper, U., and Sali, A. (2007) Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **50**, 2.9.1–2.9.31.
47. Wilson, M. A., and Brunger, A. T. (2000) The 1.0 Å crystal structure of Ca²⁺-bound calmodulin: an analysis of disorder and implications for functionally relevant plasticity. *J. Mol. Biol.* **301**, 1237–1256