

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Charles University in Prague, Faculty of Science

Doktorský studijní program: Fyzikální chemie

Ph.D. study program: Physical Chemistry

Autoreferát disertační práce

Summary of Ph.D. Thesis



**Úloha protein-proteinových interakcí v regulaci signálních
proteinů a enzymů**

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

Dalibor Košek

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

Praha/Prague 2015

Název práce: Úloha protein-proteinových interakcí v regulaci signálních proteinů a enzymů

Autor: Mgr. Dalibor Košek

Katedra: Fyzikální a makromolekulární chemie

Vedoucí práce: prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.

E-mail vedoucího práce: tomas.obsil@natur.cuni.cz

Abstrakt

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.

Klíčová slova: protein-proteinové interakce, ASK1, TRX1, 14-3-3, fosducin, Nth1, analytická ultracentrifugace, malouhlový rozptyl rentgenového záření, fluorescenční spektroskopie

Thesis title: Role of protein-protein interactions in regulation of signalling proteins and enzymes

Author: Mgr. Dalibor Košek

Department: Physical and Macromolecular Chemistry

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

E-mail of supervisor: tomas.obsil@natur.cuni.cz

Abstract

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.

Key words: protein-protein interaction, ASK1, TRX1, 14-3-3, phosducin, Nth1, analytical ultracentrifugation, small angle X-ray scattering, fluorescence spectroscopy

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 systémy významné jak z biologického tak lékařského hlediska:

A) Aktivace signální proteinkinasy ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase) 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 (TRX1) 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 glukózy. V případě kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* bylo zjištěno, že enzymová aktivita cytoplasmatické neutrální trehalasy 1 (Nth1) 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 podstata této interakce rovněž není dostatečně popsána.

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

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

METODY CHARAKTERIZACE

V této práci byly charakterizovány přednostně protein-proteinové interakce mezi známými vazebnými partnery. Ve všech případech se jednalo o eukaryotické intracelulární proteiny, které bylo nutné připravit rekombinantními postupy v expresním systému *Escherichia coli* BL21(DE3) s fúzní histidinovou kotvou pro ulehčení izolace z komplexní proteinové směsi. Všechny proteiny společně s jejich mutanty byly purifikovány kombinací chromatografických metod - niklové chelatační chromatografie, chromatografii na iontoměničích a gelové permeační chromatografie jako poslední krok. Jejich čistota a integrita byla ověřena polyakrylamidovou elektroforesou v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE).

Pro úvodní biofyzikální charakterizaci proteinů byla s výhodou využita analytická ultracentrifugace (AUC, metoda měření sedimentační rychlosti). S její pomocí lze měřit sedimentační vlastnosti částic prostřednictvím časové a radiální změny absorbance nebo změny indexu lomu v kyvetě. Vzhledem k tomu, že sedimentační rychlost závisí na tvaru a velikosti částic, lze tak odhadnout jejich relativní molekulovou hmotnost v roztoku za nativních podmínek bez dalších modifikací vzorku. Toho lze využít pro určování oligomerního stavu, integrity i čistoty vzorku a též ke studiu termodynamických vlastností směsi asociujících proteinů v závislosti na různých podmínkách, zejména určení zdánlivé disociační konstanty komplexů (K_d), což v kombinaci s bodovou mutagenézí přináší důležitou informaci o interakčním rozhraní mezi proteiny.

Pro zjištění struktury studovaných komplexů s nízkým rozlišením byla užitá metoda maloúhlového rozptylu světla SAXS na synchrotronu DESY (Petra III) v Hamburгу. Tímto způsobem lze získat strukturní informaci přímo o částici v nativním prostředí v roztoku, ovšem na rozdíl od rentgenostrukturní analýzy krystalů nelze vyřešit strukturu s atomárním rozlišením. Kromě základních charakteristik odečtených z rozptylových dat (relativní molekulová hmotnost, gyrační poloměr, Porodův objem, maximální meziatomová vzdálenost) je však možné pomocí *ab initio* modelování získat i model tvaru částice, jehož teoretická rozptylová křivka je ve shodě s experimentálními daty.

Ke studiu změn na úrovni sekundární a terciární struktury byla ve spolupráci s Fyzikálním ústavem Matematicko-Fyzikální fakulty Univerzity Karlovy použita metoda měření časově rozlišeného dohasínání intenzity i anizotropie fluorescence tryptofanu. Fluorescenční vlastnosti této aminokyseliny jsou silně závislé na polaritě okolí a jejích rotačních či dalších pohybových možnostech. Lze tak sledovat i jemné změny v okolí této aminokyseliny, její zapojení to vazebných interakcí či redukci její flexibility.

Kombinace všech těchto metod dává dohromady ucelený obraz faktorů na nichž je protein-protein interakce závislá, popřípadě jaké má důsledky pro strukturu proteinu a lze na jejich základě diskutovat úlohy těchto interakcí.

DISKUSE

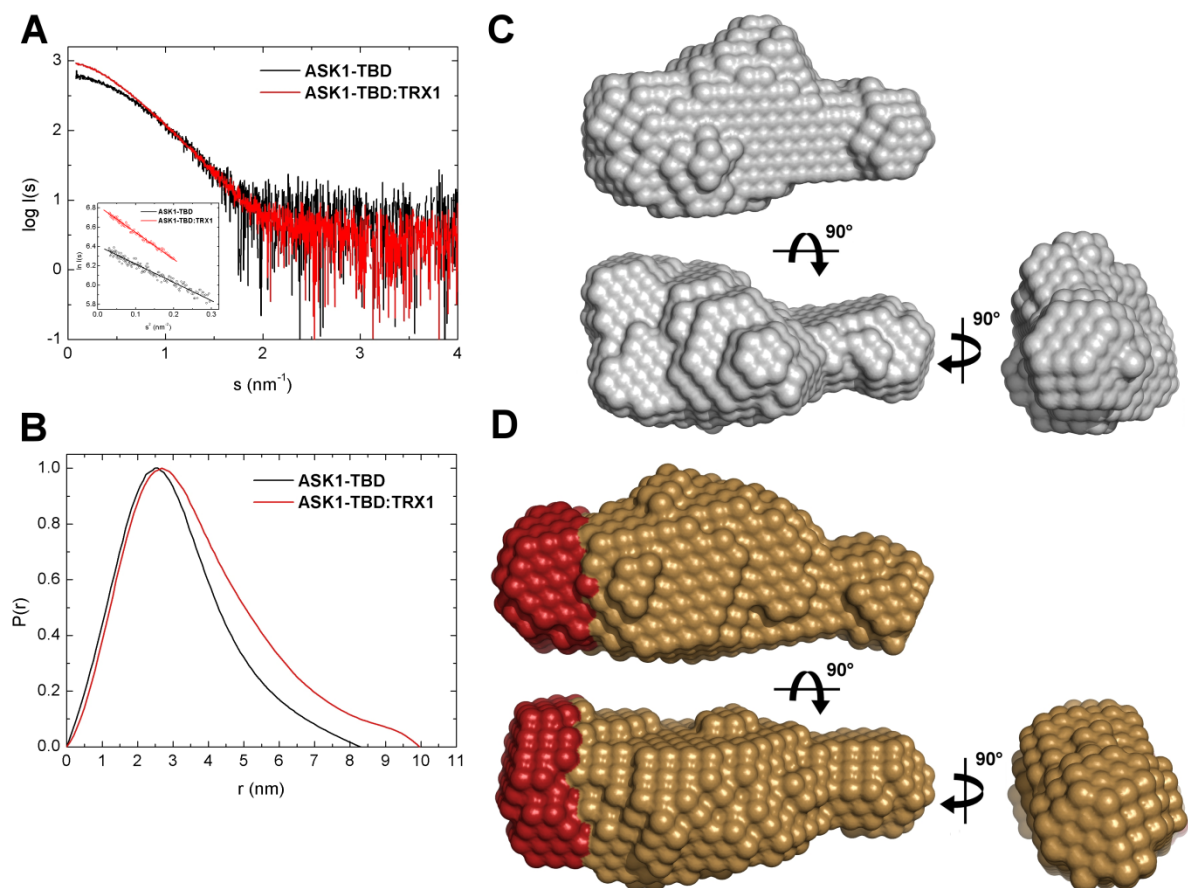
ASK1 a TRX1

TRX1 interaguje s N-koncovou částí ASK1 (použitý DNA konstrukt začínal 88. aminokyselinou a končil 302., ASK1-TBD), této interakce je však schopný pouze TRX1 v redukováném stavu a to v poměru 1:1 s K_d přibližně 300nM podle sedimentační analýzy AUC. Oxidovaný TRX1 naopak vykázal signifikantně nižší vazebnou afinitu s K_d přibližně 6 μ M, což potvrzuje, že oxidace TRX1 vazbu k ASK1-TBD zeslabuje. Nicméně mechanismus, který vede k zeslabení vazby je stále nejasný. Bylo zjištěno, že mutant TRX1, kde jsou oba cysteiny 32 a 35 reverzibilně tvořící intramolekulární disulfidovou vazbu v aktivním centru vyměněny za serin (TRX CS), nevykazuje významné vazebné schopnosti (K_d přibližně 0,5mM). To potvrzuje předchozí zjištění o důležitosti těchto dvou aminokyselin, ovšem vazba zároveň není zprostředkována mezimolekulární disulfidovou vazbou, neboť experimenty byly prováděny za redukčních podmínek.

Katalytický motiv lidského TRX1 rovněž obsahuje tryptofan na pozici 31, přičemž v této práci bylo ukázáno, že se interakce mezi TRX1 a ASK1-TBD 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 významný pokles oproti nemutované variantě ASK1-TBD. Časově rozlišené měření dohasínání intenzity i anizotropie fluorescence tryptofanu taktéž v tomto případě ukázalo, že vazba TRX1 na ASK1-TBD zvyšuje střední dobu života tryptofanu a potlačuje i lokální segmentální dynamiku (absence krátkých korelačních časů v případě komplexu), což lze považovat za přímý důsledek interakce této aminokyseliny s ASK1-TBD.

Výsledky sedimentační analýzy a měření fluorescence rovněž naznačují, že cystein 250 v sekvenci ASK1, který již dříve byl popsán jako zásadní pro interakci TRX1 a ASK1-TBD, je lokalizována v těsné blízkosti společného interakčního rozhraní, neboť její mutace za serin (ASK1 C250S) zvýší K_d přibližně na 50 μ M a tryptofan 31 se pravděpodobně váže jiným mechanismem, jak napovídají odlišné hodnoty středních dob života i rotačně korelačních časů.

Experimenty se SAXS bylo potvrzeno, že ASK1-TBD je v roztoku monomer a nabývá kompaktního mírně asymetrického tvaru. 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 *ab initio* modelováním provedeným prof. RNDr. Tomášem Obšilem, Ph.D pomocí serveru Robetta. Na jeho základě bylo ukázáno, že TRX1 se váže v blízkosti segmentů zodpovědných za dimerizaci ASK1 nutné pro aktivaci. TRX1 svojí vazbou tento proces pravděpodobně blokuje.



Obr. 1: Strukturální 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 1: Přehled časově rozlišeného zhášení fluorescence tryptofanu 31 v TRX1

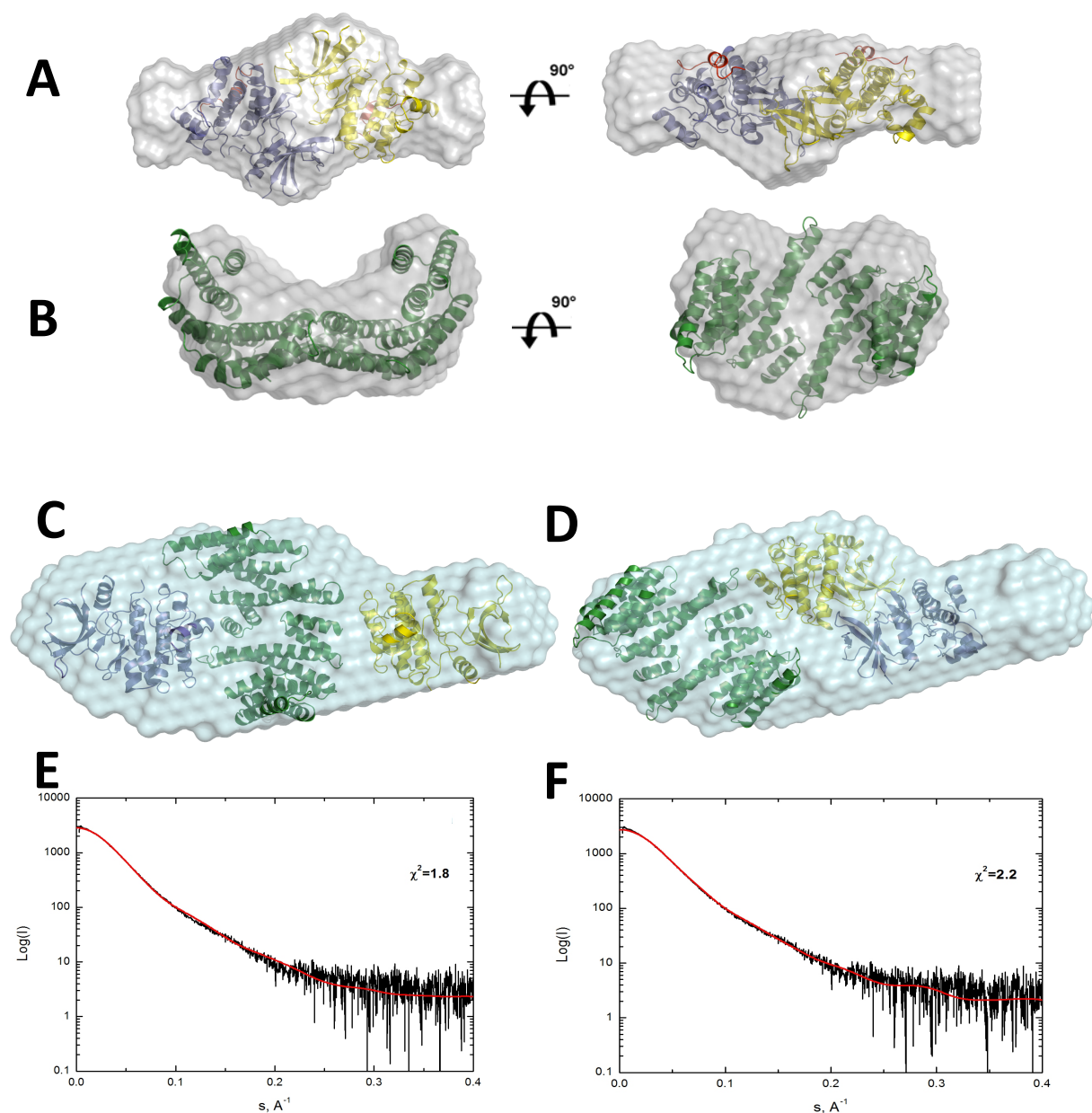
Vzorek	τ_{mean} (ns)	β_1	ϕ_1 (ns)	β_2	ϕ_2 (ns)	β_3	ϕ_3 (ns)	β_{long}	ϕ_{long} (ns)
TRX1	1,62	0,018	< 0,1	0,069	1,7	-	-	0,133	10
TRX1+ASK1-TBD	3,34	-	-	-	-	0,079	3,3	0,141	30
TRX1+ASK1-TBD C250S	4,52	0,026	<0,1	0,024	1,3	0,034	3,8	0,136	38

τ_{mean} střední doba života excitovaného stavu
 β_x amplitudy rotačně korelačních časů x-té komponenty
 ϕ_x rotačně korelační časy x-té komponenty

ASK1 a protein 14-3-3 ζ

Pro odhalení podstaty inhibice byl připraven konstrukt ASK1, který v sobě obsahoval kinasovou doménu (659-979) a vazebné místo pro protein 14-3-3, které bylo modifikováno pro fosforylaci pomocí komerční PKA (ASK1-CD). Místo 14-3-3 ζ byla použita zkrácená varianta 14-3-3 $\zeta\Delta$ C bez flexibilního C-konce, jež vykazovala podle sedimentačních dat vyšší vazebnou afinitu než samotné 14-3-3 ζ . Hodnota K_d pro tento komplex byla určena na přibližně 4 μ M za použití AUC, vazebného modelu 2:2 s předpokladem dynamické rovnováhy a nedisociujících dimerů ASK1-CD i 14-3-3 $\zeta\Delta$ C (slabší transientní interakce).

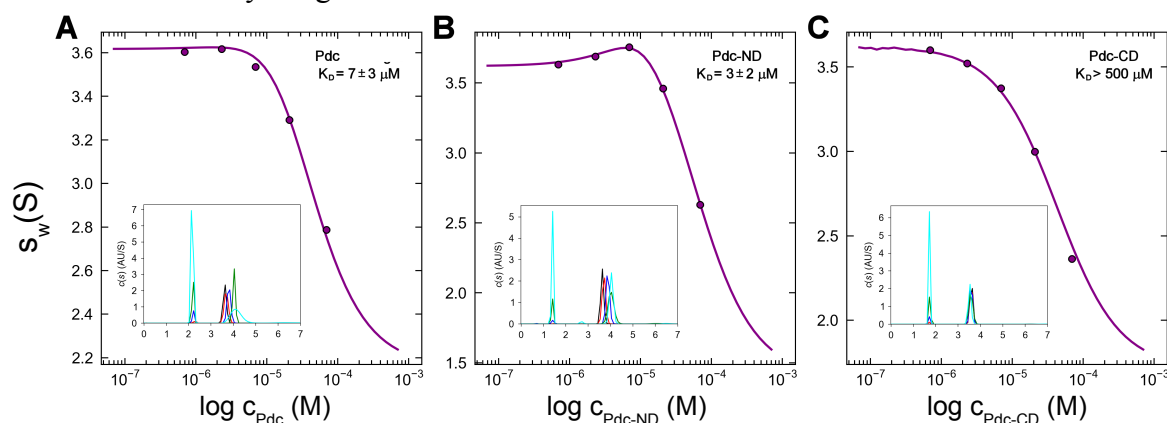
Vzhledem k charakteru vazby byla pro získání strukturního náhledu použita metodika SAXS. Jejím prostřednictvím byly potvrzeny data z AUC. Tvary samotných proteinů jsou plně ve shodě s jejich známými krystalovými strukturami. U ASK1-CD jsou po obou stranách modelu kulovité oblasti, které se strukturou 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. 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, což by odpovídalo sedimentačním analýzám a zjištění slabší transientní interakce mezi ASK1-CD a 14-3-3 $\zeta\Delta$ C. Vzhledem k asymetrickému tvaru komplexu taktéž pravděpodobně nelze předpokládat, že by se ASK1-CD vážala na 14-3-3 $\zeta\Delta$ 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) μ M pomocí sedimentační rovnováhy při koncentraci vzorku 10 μ M. V tomto případě pravděpodobně nelze předpokládat ekvivalentnost obou vazebných míst. 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 $\zeta\Delta$ 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.



Obr 2: Modely tvarů ASK1-CD a jejího komplexu s 14-3-3ζΔC pomocí SAXS. A) 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. B) Zprůměrované vypočítané obálky z programu DAMMIN pro 14-3-3ζΔC s vloženým modelem krystalové struktury. C, D) 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. C) Model, kdy se na dimer 14-3-3ζΔC váží monomery ASK1-CD na dvě různá místa. D) Model interakce dimeru 14-3-3ζΔC s dimerem ASK1-CD. E,F) Modely z C (E) a D (F) jsou podle hodnoty χ^2 v dobré shodě s experimentálními daty (černě). Teoretické rozptylové křivky (červeně) superimponovaných podjednotek byly získány pomocí programu CRYOSOL.

Fosducin a protein 14-3-3 ζ

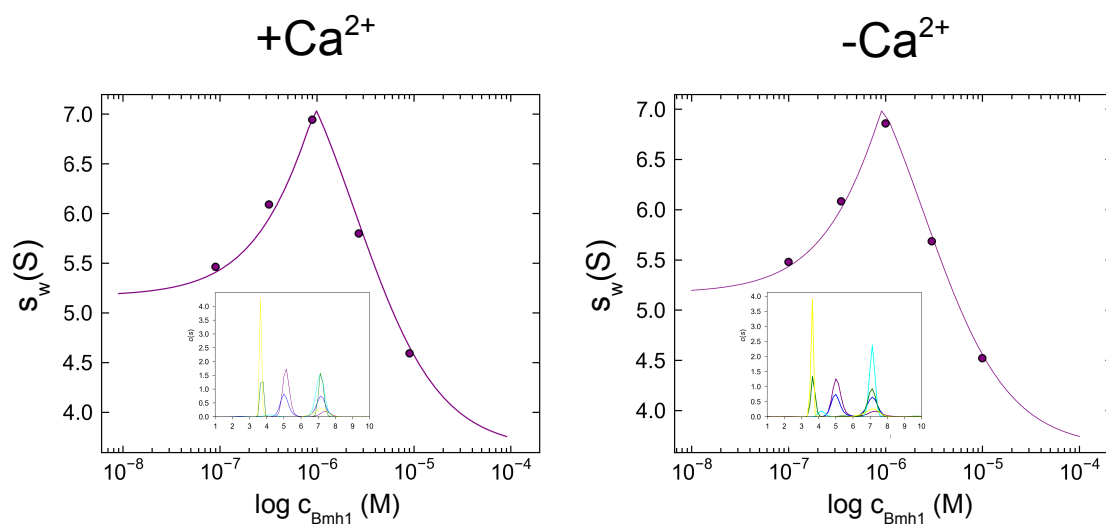
Protein 14-3-3 se podílí na regulaci dalšího proteinu, který je významným regulačním prvkem tentokrát v biochemii zraku, fosducinu (Pdc). Teoretické predikce i biofyzikální experimenty jasně ukazují, že N-koncová část Pdc (Pdc-ND) nesoucí vazebné místo pro protein 14-3-3 vykazuje v porovnání s C-koncovou (Pdc-CD) prvky vnitřní nestrukturovanosti a že zaujímá velmi objemnou konformaci. Rovněž bylo zjištěno z fluorescenčních experimentů, že Pdc se na protein 14-3-3 $\zeta\Delta$ C (používaný místo přirozeného 14-3-3 ζ ze stejného důvodu jako u ASK1-CD, vyšší síly vazebné interakce) váže i mimo vazebnou kavitu. Sedimentační analýza AUC separovaných částí Pdc provedená v rámci této práce však odhalila, že separovaný Pdc-CD nevykazuje žádnou signifikantní vazbu na 14-3-3 $\zeta\Delta$ C a Pdc-ND, který naopak vykazuje vazbu silnější než v případě Pdc, je tak za stabilitu komplexu fosforylovaného Pdc:14-3-3 $\zeta\Delta$ C plně zodpovědný (viz obr 3). Naznačuje to též, že pozorované interakce mezi 14-3-3 $\zeta\Delta$ C a Pdc-CD podporuje efekt lokální koncentrace po vazbě N-terminálního segmentu fosducinu do vazebné kavity 14-3-3 $\zeta\Delta$ C. Komplex Pdc:14-3-3 $\zeta\Delta$ 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 podjednotkami transducinu, známého interakčního partnera Pdc, zatím co Pdc-CD se zdá odpovědný spíše za blokaci interakce těchto podjednotek v komplexu s buněčnou membránou. Interakce fosducinu se 14-3-3 ζ tak může stéricky blokovat právě oblast interagující s transducinem a modifikovat jeho strukturu, tak aby docházelo k pomalejší defosforylaci indukované světelným signálem.



Obr. 3: AUC. Vážené průměry sedimentačních koeficientů s_w 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 v závislosti na koncentraci Pdc (0,7-70 μ M) s konstantní koncentrací 14-3-3 $\zeta\Delta$ C (14 μ M). B) Izoterma vážených průměrů sedimentačních koeficientů v závislosti na koncentraci Pdc-ND (0,7-70 μ M) s konstantní koncentrací 14-3-3 $\zeta\Delta$ C (14 μ M). C) Izoterma vážených průměrů sedimentačních koeficientů v závislosti na koncentraci Pdc-CD (0,7-70 μ M) s konstantní koncentrací 14-3-3 $\zeta\Delta$ C (14 μ M).

Nth1 a vliv vápníkových kationtů na vazbu Bmh1

Analog proteinu 14-3-3 v *Saccharomyces cerevesiae*, Bmh1, byl popsán jako aktivační element proteinu 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 zde i v katalytické doméně Bmh1 indukují 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. Bylo navrženo, že Ca^{2+} vazebný motiv nabývá v závislosti na přítomnosti Bmh1 a iontů Ca^{2+} rozdílných konformací, vysvětlujících rozdílné aktivity Nth1. Tato doména by též 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 AUC, 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, mechanismus potenciace enzymové aktivity v přítomnosti vápenatých iontů však nelze vysvětlit zvýšením nebo jinou modulací vazebné afinity Bmh1 k Nth1.



Obr. 4: AUC. 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 CaCl_2 10mM tak bez vápníku byla ve všech experimentech koncentrace Nth1 konstantní 1 μM , koncentrace Bmh1 se pohybovala v rozmezí 0,2-20 μM . V obou případech byla K_d stanovena téměř totožně na 10nM s 95% intervalem spolehlivosti < 21nM.

ZÁVĚR

Závěrem lze konstatovat, že se podařilo splnit naprostou většinu vytyčených cílů, kromě kompletní charakterizace interakce kinasové domény ASK1 s proteinem 14-3-3, jejíž další výzkum bude požadovat další experimenty. Výsledky v této práci přispěly k objasnění strukturních aspektů aktivace ASK1, regulace biologické funkce fosducinu i regulace aktivity Nth1. Poznatky zejména z vývoje purifikačních protokolů a strukturních charakterizací získané během práce otevřely cestu zkoumání strukturních mechanismů těchto na atomární úrovni. Výsledky byly publikovány v rámci třech odborných článků v magazínu *Journal of Biological Chemistry*.

INTRODUCTION

This Ph.D. thesis is a part of extensive joint research projects between groups of prof. Tomas Obsil, Ph.D. at Charles University in Prague, Faculty of Science and RNDr. Veronika Obsilova, Ph.D at the Institute of Physiology AS CR. Their two groups share a common interests and therefore collaborate very closely. The main interest of this work is studying molecular mechanisms of regulation of chosen signalling proteins or enzymes and its dependence on protein-protein-interactions with known interaction partners, predominantly the protein 14-3-3. Particularly, three biologically and medically important processes were investigated:

A) The activation of signalling proteinkinase ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase) is a key initiation process of MAPK signalling cascade which leads to the apoptosis with extensive consequences to every aspect of cellular and tissue physiology. There are two proteins among others which are involved in the activation of ASK1, its two physiological inhibitors protein 14-3-3 and thioredoxin 1 (TRX1) which interact with enzymatically inactive form of ASK1. In the presence of reactive oxygen species both proteins dissociate and ASK1 is activated. Although, this process was described long ago, its molecular mechanism is still unknown because of the lack of structural data. The investigation of structural mechanisms related to the activation of ASK1 is therefore necessary for complete understanding of apoptotic regulation and explanation of consequent pathologies.

B) The G protein signalization has a key role in the signal transduction across the cytoplasmic membrane. Disorders linked with this process are one of the main interests of pharmaceutical industry because they are responsible for many human diseases. One of the known regulatory mechanism of G protein signalization is the interaction between protein phosducin and G $\beta\gamma$ subunit of heterotrimeric G protein with overall negative effect. Phosducin itself is regulated by the interaction with the protein 14-3-3 but the structural mechanism of this process which is particularly important in the biochemistry of vision is unknown.

C) Trehalose is an important storage disaccharide and potential signalling molecule important for the regulation of growth and metabolism of different species. Its concentration is controlled by the enzyme trehalase which cleaves trehalose into two glucose molecules. In case of *Saccharomyces cerevisiae*, it was discovered that the enzymatic activity of cytoplasmic neutral trehalase 1 (Nth1) is beside calcium cations tightly regulated also with the interaction with Bmh1, the yeast analog of 14-3-3, through two phosphorylation sites at the N-terminus of the protein. Structural data of this process are also currently unavailable.

This work is mainly focused on the clarification of structural bases and explanation of the role of protein-protein interactions involved in described processes using various biochemical and biophysical methods. Special attention will be pointed to the low resolution structures of protein complexes, to the tracking of segmental conformation changes using fluorescence spectroscopy and evaluation of binding affinities using analytical ultracentrifugation.

GOALS

1. **Biophysical and structural analysis of complexes involving signalling protein kinase ASK1 and its two physiological inhibitors TRX1 and the 14-3-3 protein:**
 - Complex between thioredoxin-binding domain of ASK1 (ASK1-TBD) with TRX1
 - Biophysical characterization of the complex ASK1-TBD:TRX1
 - Localization of the interaction interface and possible inducible conformational changes
 - Solution of the structure with low resolution
 - Proposal of the inhibitory mechanism of ASK1 through TRX1
 - Complex between catalytic domain of ASK1 (ASK1-CD) with the 14-3-3 protein
 - Biophysical characterization of the complex ASK1-CD:14-3-3
 - Solution of the structure with low resolution

2. **Studying of interaction between the 14-3-3 protein and separated domains of phosducin**
 - Biophysical characterization of the separated domains of phosducin
 - Characterization of the influence of separated domains of phosducin on the interaction with the 14-3-3 protein

3. **Studying the influence of calcium cations on the interaction between Nth1 and Bmh1**
 - Characterization of the stability of the complex Nth1:Bmh1 in the presence of calcium cations

CHARACTERIZATION METHODS

This work mainly consists of the characterization of protein-protein interactions between previously described binding partners. They were all eucaryotic intracellular proteins and had to be prepared recombinantly in the expression system *Escherichia coli* BL21(DE3) with a fusion His-tag to make the purification from the complex protein mixtures easier. All proteins and their mutants were purified with the combination of chromatographic approaches – nickel-chelating chromatography, ion-exchange chromatography and size-exclusion chromatography as a last step. Their purity and integrity were verified using polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecylsulphate (SDS-PAGE).

The first biophysical characterization was conducted using analytical ultracentrifugation (AUC, sedimentation velocity). This method allows an accurate determination of sedimentation properties of different particles through the temporal and radial dependent measurement of absorbance or refractive index. The sedimentation velocity is dependent on the size and shape of the particle therefore an approximate value of relative molecular mass can be estimated under native conditions without any modifications. This can be used for the evaluation of oligomeric state of the particle, its purity, integrity. The thermodynamic features can also be studied in terms of apparent dissociation constants of protein complexes which brings an important information about interaction interface in combination with site-directed mutagenesis.

The small-angle X-ray scattering (DESY, Petra III beamline, Hamburg) was used to calculate low resolution structures of studied complexes. This technique provides a way to get a structural information about a molecule in native environment but the precise atomic resolution known from X-ray crystallography is unachievable. In addition to the basic characteristics extrapolated from scattering data (radius of gyration, relative molecular mass, Porod volume, maximal interatomic distance) it is possible to calculate a shape (a bead model) of the particle using *ab initio* modelling whose scattering curve is in agreement with experimental data.

In collaboration with the Institute of Physics at Charles University in Prague, Faculty of Mathematics and Physics, we used time resolved measurements of tryptophan fluorescence intensity and anisotropy decay to determine conformational changes on the level of secondary and tertiary structure. Fluorescence of this amino acid residue is very dependent on the polarity of its close environment and on its motion or rotational freedom. Even small changes in the proximity of tryptophan are observable using this approach as well as its employment into protein-protein interaction.

Combination of all these methods gets together a comprehensive insight into protein-protein interaction and how it affects the structure of proteins. Based on these results it is possible to further discuss purpose of this interactions.

DISCUSSION

ASK1 and TRX1

TRX1 interacts with N-terminal part of ASK1 (used construct DNA started at 88th amino acid and ended at 302nd, ASK1-TBD). Only reduced TRX1 is able to interact with ASK1-TBD in 1:1 molar ratio with K_d approximately 300nM according to AUC. On the other hand, oxidized TRX1 has significantly lower binding affinity with K_d approximately 6 μ M confirming that the oxidation of TRX1 disturbs the binding to ASK1-TBD. However, the mechanism which leads to this effect is still unclear. It was shown that the mutant of TRX1 with both cysteins 32 and 35 mutated into serines (which form a reversible disulfide bridge in the wild type, TRX CS) doesn't bind to the ASK1-TBD (K_d approximately 0,5mM). This observation confirms previous findings that these two residues are very important in this interactions but the interaction isn't mediated by a disulfide bridge since all experiments were performed under reducing conditions.

Catalytic motif of human TRX1 also contains a tryptophan as a 31st amino acid and in this work it was shown that it participate directly in the interaction between TRX1 and ASK1-TBD. A mutant TRX1 W31F where the tryptophan was mutated into phenylalanine has significantly lower K_d (approximately 30 μ M) than wild type according to the AUC analysis. Time resolved measurements of tryptophan fluorescence intensity and anisotropy decay also indicated in this case that the interaction between TRX1 and ASK1-TBD significantly increases the mean excited-state lifetime and decreases segmental dynamics (resulting in the absence of the shortest rotation-correlation times in the complex). This can be considered as a direct consequence of the residue interacting with ASK1-TBD. Results from sedimentation analysis and fluorescence measurements also confirm that the cystein 250 (according to human ASK1) is localized in close proximity to the complex interaction interface as it was suggested previously. Its mutation into serine shifts the value of K_d to approximately 50 μ M and according to fluorescence measurements the tryptophan 31 binds to the ASK1-TBD with different mechanism regarding different mean excited-state lifetime and rotation-correlation times.

SAXS experiments confirmed that ASK1-TBD is a monomeric specie in solution and has a compact slightly asymmetric shape. The complex ASK1-TBD:TRX1 is similar but there is an extension in one direction. A comparison of both models revealed that the volume added to the ASK1-TBD is TRX1 interacting through large interface but without any signs of drastic conformation change although changes under the resolution of SAXS can't be ruled out. A structural model of ASK1-TBD was calculated *ab initio* by prof. RNDr. Tomas Obsil, Ph.D. using Robetta server and it shows that TRX1 is binding probably in a close vicinity of ASK1 segments responsible for ASK1 dimerization which is necessary for enzyme activation. Therefore, TRX1 may block this via interaction with ASK1.

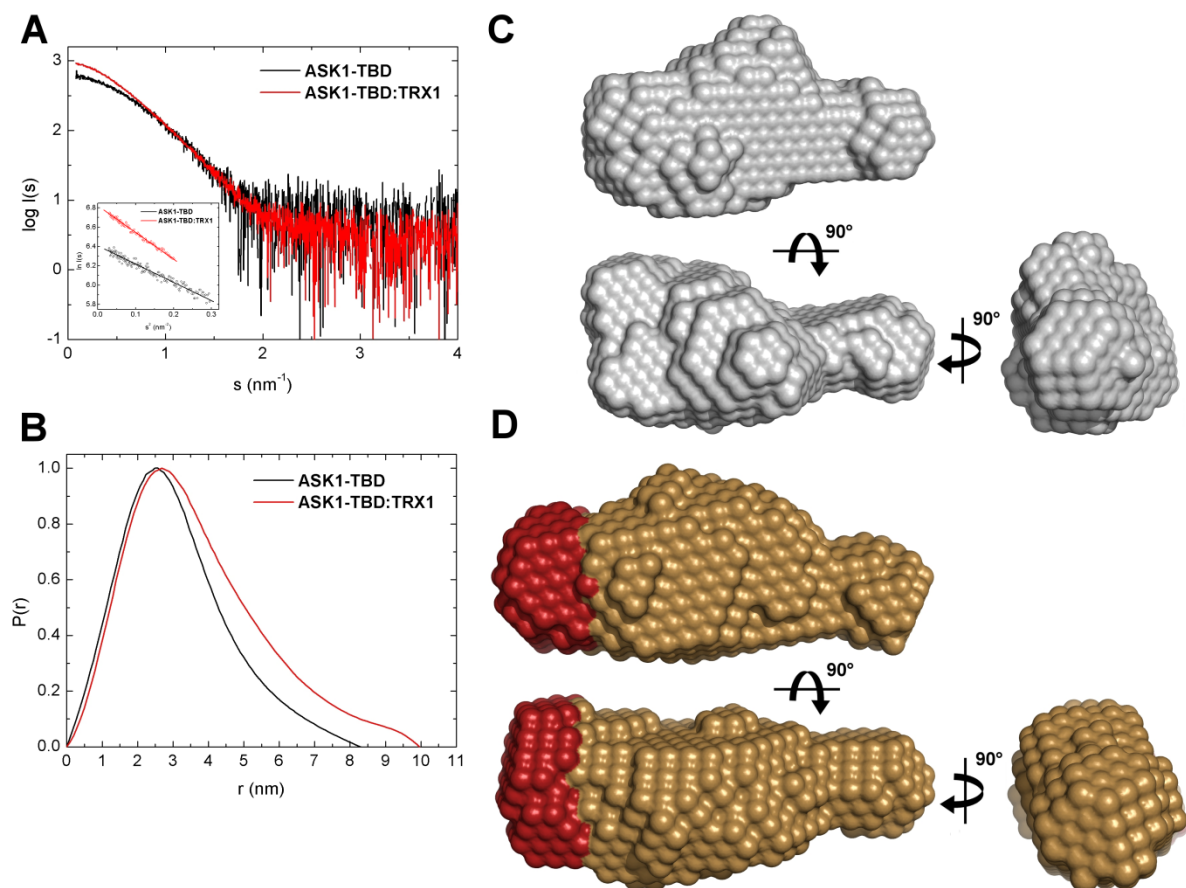


Fig. 1: Structural characterization of ASK1-TBD and its complex with reduced TRX1 using SAXS. A) Scattering intensity as a function of scattering vector s ($s = 4\pi\sin(\theta)/\lambda$, where 2θ is a scattering angle and λ wavelength). Inset shows a Guinier plot of ASK1-TBD (2,3 mg/ml) and ASK1-TBD:TRX1 (6 mg/ml). B) Distribution of intramolecular distances $p(r)$. C) Calculated and averaged bead models from software DAMMIN for ASK1-TBD alone. D) Calculated and averaged bead models from software DAMMIN for ASK1-TBD:TRX1. Main difference between models is shown in red.

Table 1: Summary of time-resolved measurement of tryptophane fluorescence intensity and anisotropy decay

Sample	τ_{mean} (ns)	β_1	ϕ_1 (ns)	β_2	ϕ_2 (ns)	β_3	ϕ_3 (ns)	β_{long}	ϕ_{long} (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

τ_{mean} mean excited-state lifetime

β_x amplitudes of rotation-correlation times for component x

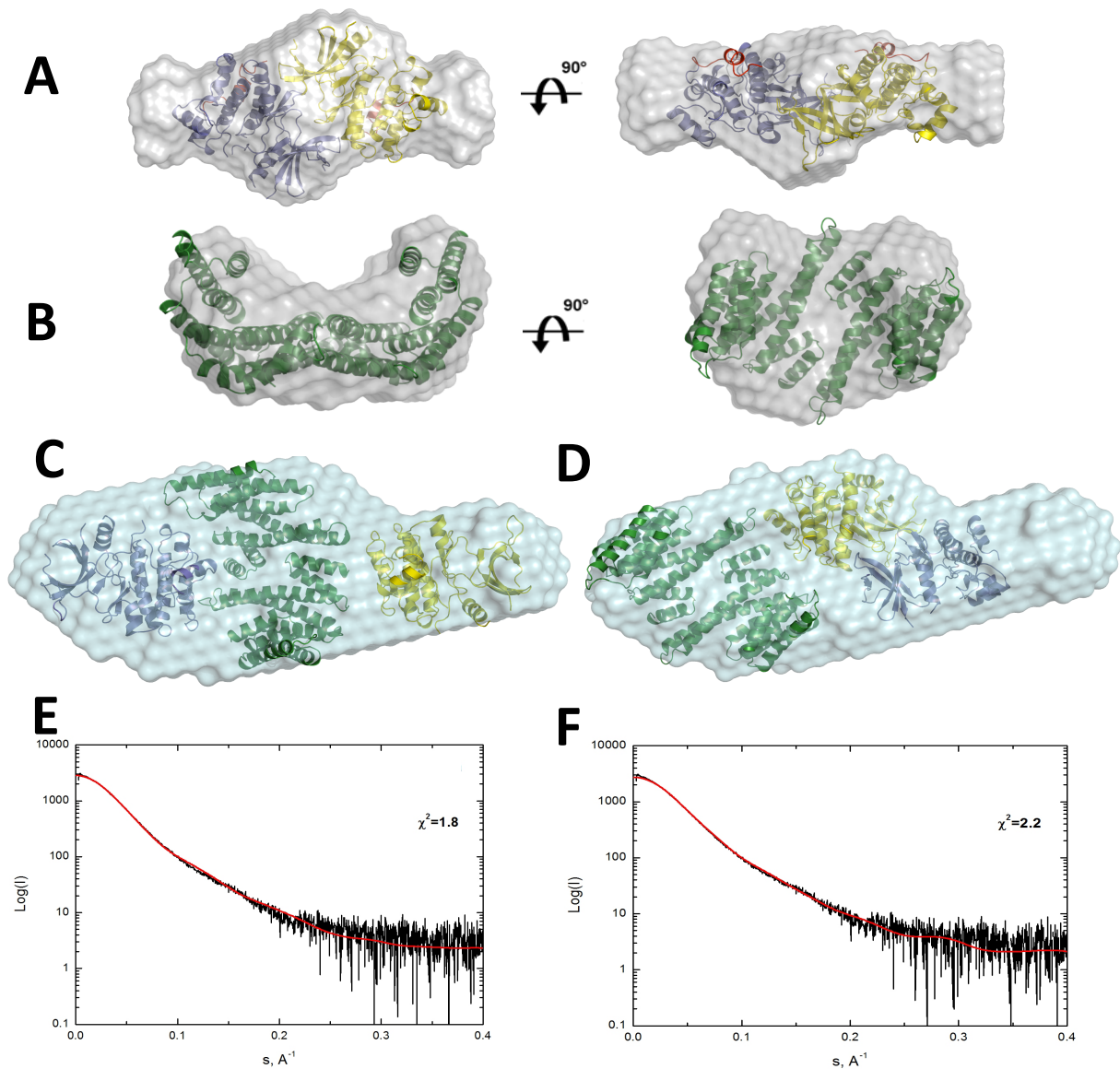
ϕ_x rotation-correlation times for component x

ASK1 and the 14-3-3 ζ protein

To investigate the nature of inhibition the DNA construct of catalytic domain of ASK1 together with 14-3-3 binding site was prepared (ASK1-CD). The binding site was modified to be suitable for the phosphorylation with commercial PKA. The 14-3-3 ζ Δ C without C-terminal flexible segment was used instead of 14-3-3 ζ because of higher binding affinity according to the sedimentation analysis. The value of K_d for this complex was estimated to be approximately 4 μ M (weak, transient interaction) using AUC, binding model with 2:2 stoichiometry and with prior knowledge of dynamic equilibrium of non-dissociating dimers ASK1-CD and 14-3-3 ζ Δ C.

Regarding the nature of this interaction, SAXS was used to get an insight into the complex structure. Results confirmed data from AUC, mainly the binding stoichiometry. The bead models of both proteins alone are in an agreement with their known crystal structures. In the case of ASK1-CD there are two spherical parts which are rather different but they can be interpreted as a flexible C-terminus possessing 14-3-3 binding site absent in the crystal. The bead model for a complex has a compact and highly asymmetric shape but its interpretation in terms of the structure of position of different subunits is rather ambiguous. There are two meaningful options of interpretation. The first assume that the interaction is a dimer:dimer like, but only one monomer of each dimer is actually interacting. According to this model, dimers are non-dissociative and interaction interface is rather small corresponding to the weak binding affinity. However, regarding the highly asymmetric shape, the dissociation of ASK1-CD is taken into account in the second option. Although, AUC sedimentation velocity of this dimer never showed any signs of a monomer even in highly diluted solutions, the value of K_d was previously estimated to be 0.22 μ M using sedimentation equilibrium at 10 μ M of ASK1-CD. Therefore, this kind of interaction it is possible but clearly two binding sites for ASK1-CD would have different binding affinities because they wont be equivalent. In addition, the position of flexible C-terminus of ASK1-CD in the bead model of the complex is highly speculative at least and there is a possibility that some parts of the model are in fact averages of different conformations of this segment. To make this ambiguity clear, more biophysical experiments have to be carried out to understand the structure of the complex between 14-3-3 and ASK1-CD.

There is also an option that the stability of the complex observed *in vivo* is affected by completely different regions of ASK1 rather than catalytic domain and the function of 14-3-3 is more complex than anticipated. Results regarding ASK1-CD haven't been publish yet.



Pic. 2: Bead models of ASK1-CD and its complex with 14-3-3 $\zeta\Delta$ C using SAXS. A) Calculated and averaged bead models from software DAMMIN for ASK1-CD alone with imposed crystal structure. Flanking spherical parts represent flexible C-terminal segment with 14-3-3 binding site absent in the crystal structure. B) Calculated and averaged bead models from software DAMMIN for 14-3-3 $\zeta\Delta$ C with imposed crystal structure. C,D) Superimposition of crystal structures into the DAMMIN bead model of ASK1-CD:14-3-3 $\zeta\Delta$ C (done by prof. RNDr. Tomas Obsil, Ph.D.) ASK1-CD in blue and yellow, 14-3-3 $\zeta\Delta$ C in green. C) A model of the complex with dissociated ASK1-CD binding to two different sites on 14-3-3 $\zeta\Delta$ C. D) A model of the complex dimer:dimer like. E,F) Models from C (E) and D (F) are both in a good agreement with experimental data in terms of the value χ^2 . Theoretical scattering curves were calculated from the crystal structures using CRYOSOL software.

Fosducin and protein 14-3-3 ζ

The 14-3-3 protein is involved in the regulation of another protein phosphatase (Pdc) which is particularly important in the biochemistry of vision. Theoretical predictions and other biochemical experiments strongly suggest that N-terminal part of Pdc (Pdc-ND) possessing a binding site for the 14-3-3 protein has a very flexible and probably unstructured nature with extended conformation apart from a compact C-terminal part (Pdc-CD). Another fluorescence experiment also suggests that Pdc binds 14-3-3 $\zeta\Delta$ C (which has better binding affinity than the wild type as in the case of ASK1) through an interface out of the typical 14-3-3 cavity probably with the C-terminal domain. However, AUC of the separated Pdc domains performed in this work revealed that Pdc-CD mostly doesn't contribute to the interaction. On the other hand, Pdc-ND exhibits even higher binding affinity than the Pdc suggesting that this part is fully responsible for the stability of the complex Pdc:14-3-3 $\zeta\Delta$ C. The observed interaction between 14-3-3 $\zeta\Delta$ C and Pdc-CD, therefore, could be a consequence of the local concentration effect after the Pdc-ND is bound. The complex is similar to many other known complexes of the 14-3-3 protein when the 14-3-3 protein binds in addition to the phosphorylated binding motif to another part of its interacting partner through weak interactions. It was also shown that Pdc-ND contains most of the interaction surface for the interaction with its other known binding partners, subunits of transducin, while Pdc-CD probably blocks interaction of these subunits in the complex with cellular membrane. Interaction between 14-3-3 $\zeta\Delta$ C and Pdc can therefore sterically block this transducin interaction surface and modify its structure to lower the rate of dephosphorylation of Pdc which is induced by light.

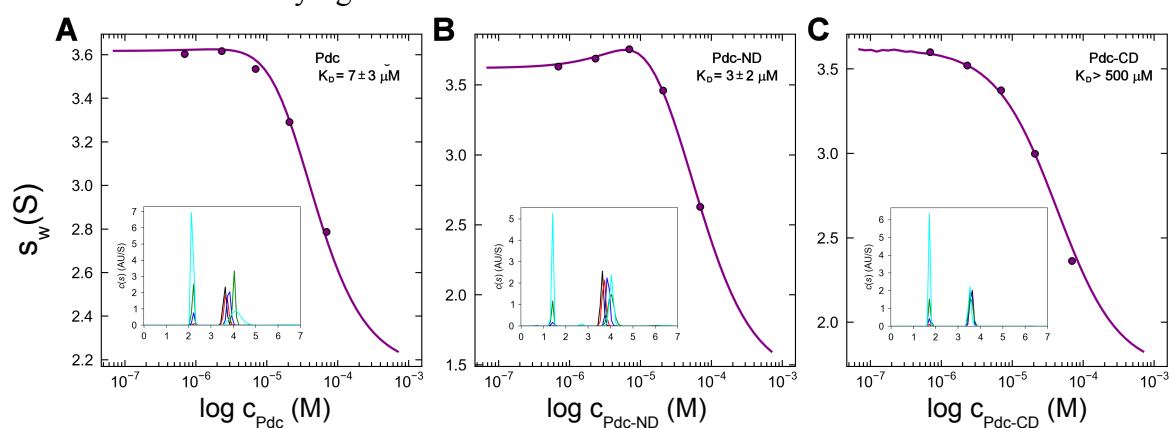
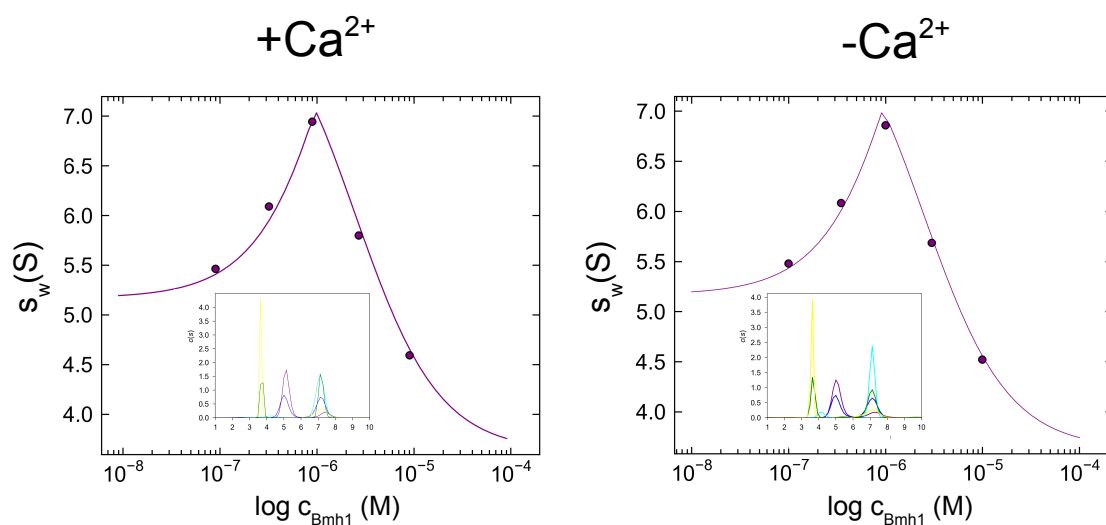


Fig 3: AUC. Weighted-averaged sedimentation coefficients s_w were calculated based on $c(s)$ distributions showed in insets. Apparent dissociation constants were calculated using nonlinear regression. A) The binding isotherm of of weighted-averaged sedimentation coefficients as a function of of the concentration of Pdc (0,7-70 μM) and constant concentration of 14-3-3 $\zeta\Delta$ C (14 μM). B) The binding isotherm of of weighted-averaged sedimentation coefficients as a function of of the concentration of Pdc-ND (0,7-70 μM) and constant concentration of 14-3-3 $\zeta\Delta$ C (14 μM). C) The binding isotherm of of weighted-averaged sedimentation coefficients as a function of of the concentration of Pdc-CD (0,7-70 μM) and constant concentration of 14-3-3 $\zeta\Delta$ C (14 μM).

Nth1 and influence of calcium cations on interaction with Bmh1

An analogue of the 14-3-3 protein in yeast, Bmh1, was described as an activation element for the protein Nth1. In this case the activation is surprisingly also dependent on the presence of Ca^{2+} in solution which binds to the "EF-hand" motif on the N-terminus of Nth1. It was revealed previously that interaction involving Bmh1 induces some conformational changes in "EF-hand" motif as well as in the catalytic domain of Nth1 leading to the activation. However, the full activation is achieved through the simultaneous interaction of Nth1, Bmh1 and calcium cations. It was proposed that the "EF-hand" motif changes conformation in the presence of calcium altering the activity and it could also modify the binding affinity between Nth1 and Bmh1. The sedimentation analysis AUC, sedimentation velocity measurement, was used for the characterization of this effect, but it doesn't revealed any significant change in terms of K_d . There is a possibility that the value of K_d is changed under the resolution of this method but regarding the determined $K_d < 21\text{nM}$, it is questionable if this change would have any significant influence. However, the importance of "EF-hand" motif was proven by other methods but the mechanism of enzymatic activity potentiation in the presence of calcium cations can't be explained by the change in the binding affinity between Nth1 and Bmh1.



Pic. 4: AUC. Weighted-averaged sedimentation coefficients s_w were calculated based on $c(s)$ distributions showed in insets. Apparent dissociation constants were calculated using nonlinear regression. The concentration of Nth1 was constant $1\mu\text{M}$ and Bmh1 was varying in the range $0,2\text{-}20\mu\text{M}$ in both cases. The concentration of CaCl_2 was 10mM as described previously. In both cases, the value of K_d was estimated to be 10nM with 95% confidence region $<21\text{nM}$.

CONCLUSION

In conclusion we can say that the most of the stated goals in this work were achieved except the full characterization of the interaction between ASK1 and the 14-3-3 protein which is still in progress and requires more experiments. Results of this work contributed to the explanation of structural aspects of the activation of ASK1, regulation of the biological function of protein phosphatase and regulation of the activity Nth1. Findings showed in this work also opened the way for the research of these interactions in atomic resolution especially protein purification protocols and structural characterization. The results were published in three different scientific articles in the magazine Journal of Biological Chemistry.

Dalibor Košek

Borská 23, Dalovice 36263, Czech Republic, kosek@natur.cuni.cz

Education

2011 - present Charles University in Prague, Faculty of Science, Czech Republic
Programme: Physical Chemistry, Ph.D. course

2009-2011 Charles University in Prague, Faculty of Science, Czech Republic
Programme: Biochemistry, Master's degree

2006-2009 Charles University in Prague, Faculty of Science, Czech Republic
Programme: Biochemistry, Bachelor's degree

Research experience

2011- present Institute of Physiology AS CR, Research Assistant

Research techniques

AUC, SAXS, ITC, Fluorescence spectroscopy, X-ray crystallography, ³²P labelling, protein expression and purification

Conferences

X Discussions in Structural Molecular Biology, Nové Hrady 2012, Abstract: Dalibor Kosek, Lenka Rezabkova, Veronika Obsilova and Tomas Obsil: Materials Structure, vol. 19, p. 26 (2012), "Preparation of the 14-3-3:ASK1 kinase complex for structural studies."

37th FEBS and 22th IUBMB 2012 Sevilla, Spain, Abstract: D. Kosek, L. Rezabkova, V. Obsilova and T. Obsil: FEBS J., vol. 279 - Supplement 1, p. 426 (2012), "Biophysical study of the protein complex 14-3-3/ASK1"

XI Discussions in Structural Molecular Biology, Nové Hrady 2013: Kosek, D., Rezabkova, L., Obsilova, V., Obsil, T.: Materials Structure, vol. 20, p. 32 (2013): "Biophysical study of the complex between the 14-3-3 protein and the kinase domain of ASK1."

9th European Biophysics Congress, Lisbon 2013: D. Kosek, L. Rezabkova, O. Petrvalska, V. Obsilova, T. Obsil: Eur. Biophys. J. (2013) 42 (Suppl 1):S1-S236: "Sedimentation analysis and enzymatic characterization of the complex between 14-3-3 protein and ASK1."

XII Discussion in Structural Molecular Biology, Nové Hrady, 2014: Kosek, D.: "Characterization of interactions between protein kinase ASK1 and its binding partners." - oral talk

Courses

FEBS Practical Course: Advanced Methods in Macromolecular Crystallization V 2012, Nové Hradý, 22-29 June 2012, Czech Republic

Analysis of Macromolecular Interactions by Isothermal Titration Calorimetry and Global Multi-method Analysis in SEDPHAT, Kaiserslautern, 28-30 November 2012, Germany

Biophysical Methods for the Thermodynamic Analysis of Macromolecular Interactions, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, 20 – 24 May 2013, U.S.A.

Small-angle neutron and X-ray scattering from proteins in solution , Institute Laue-Lavigne, Grenoble, 18-22 May 2015, France

Publications

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

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), accepted

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)

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) - review

Busek, P., Stremenova, J., Sromova, L., Hilser, M., Balaziová, 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)