

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie**

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Physical and Macromolecular Chemistry**

Doktorský studijní program: Fyzikální chemie
Ph.D. study program: Physical Chemistry

Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



Mechanismus regulace funkce fosducinu.
The mechanism of the regulation of phosducin function.

Mgr. Miroslava Kacířová

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

Praha 2016

Obsah / Contents

Obsah	3
Abstrakt.....	4
1 Úvod	5
2 Cíl práce.....	7
3 Metody.....	8
4 Výsledky a diskuze	9
4.1 Biofyzikální a strukturní charakterizace fosducinu (Pdc).....	9
4.2 Biofyzikální a strukturní charakterizace Pdc-PP a 14-3-3/Pdc-PP	11
5 Závěr	18
Curriculum vitae	19
Abstract	21
1 Introduction	22
2 Aims of the study.....	24
3 Methods	25
4 Results and discussion	26
4.1 Biophysical and structural characterization of phosducin (Pdc).....	26
4.2 Biophysical and structural characterization of Pdc-PP and 14-3-3/Pdc-PP	28
5 Conclusions	35
Použitá literatura / References:	36
Curriculum vitae	37

Abstrakt

Předkládaná disertační práce volně navazuje na mou práci diplomovou. Zabývá se studiem 30kDa proteinu fosducinu (Pdc) a mechanismem regulace jeho funkce prostřednictvím vazby s 28kDa adaptorovým proteinem 14-3-3. Oba tyto proteiny se účastní signální dráhy spojené s G-proteiny, především v procesu vidění. Pdc váže komplex $\beta\gamma$ podjednotek heterotrimerního G-proteinu transducinu ($G_t\beta\gamma$) a tím brání zpětné reasociaci $G_t\beta\gamma$ s podjednotkou $G_t\alpha$, čímž blokuje přenos světelného signálu. Tento proces se pravděpodobně uplatňuje při dlouhodobé adaptaci na změnu intenzity světla. Regulační funkce Pdc je dále regulována jeho fosforylací a následnou vazbou na protein 14-3-3. Na základě dostupných dat bylo spekulováno, že vazba 14-3-3 je klíčová pro inhibici interakce mezi fosforylovaným Pdc (Pdc-PP) a $G_t\beta\gamma$. Vznik komplexu 14-3-3/Pdc-PP pak vede k reasociaci trimerního transducinu a zesílení přenosu světelného signálu. Mechanismus, jakým protein 14-3-3 inhibuje interakci Pdc s $G_t\beta\gamma$, je však stále neznámý.

Cílem této disertační práce bylo objasnit strukturu volného Pdc a jeho komplexu s proteinem 14-3-3 a s pomocí získaných dat navrhnout mechanismus regulace funkce Pdc. Struktura Pdc a komplexu 14-3-3/Pdc-PP byla studována celou řadou biofyzikálních metod včetně malouhlového rozptylu rentgenového záření (SAXS), NMR, H/D výměny spojené s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS) či metod fluorescenční spektroskopie. Získané výsledky ukázaly, že N-terminální doména Pdc (Pdc-ND) je vnitřně nestrukturovaný protein. Fosforylace Pdc ovlivňuje konformaci nejen v rámci Pdc-ND, kde se nacházejí obě fosforylační místa, ale i v rámci strukturované C-terminální domény (Pdc-CD). Protein 14-3-3 váže Pdc-PP s mikromolární vazebnou afinitou a tvorba komplexu ovlivňuje konformaci a snižuje flexibilitu zejména fosforylované Pdc-ND. Obě fosforylační místa Pdc jsou klíčová pro vazbu proteinu 14-3-3. Velká část Pdc-ND, která tvoří většinu vazebného povrchu Pdc pro $G_t\beta$, se v komplexu se 14-3-3 nachází buď v centrálním kanálu molekuly dimeru 14-3-3, nebo v blízkosti jeho povrchu. Vazba 14-3-3 tedy blokuje vazebný povrch Pdc pro $G_t\beta$ a tím inhibuje tuto interakci. NMR a HDX-MS měření dále ukázala, že Pdc-PP zůstává i po navázání na protein 14-3-3 flexibilní, což naznačuje, že by se mohlo jednat o tzv. „fuzzy“ komplex. Získané výsledky také naznačují, že vazba proteinu 14-3-3 zpomaluje defosforylací Pdc-PP.

1 Úvod

Předkládaná disertační práce je strukturní studií proteinu fosducinu (Pdc) a komplexu s jeho vazebným partnerem, proteinem 14-3-3. Struktura tohoto komplexu nebyla doposud objasněna. Motivací projektu je přispět k pochopení úlohy proteinu 14-3-3 v regulaci funkce Pdc. Znalost struktury je důležitým nástrojem pro pochopení funkce proteinů a jejich komplexů. Tato disertační práce je součástí dlouhodobého projektu vedeného pod dohledem prof. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D. z PřF UK a navazuje na mou práci diplomovou [1].

Ke studiu struktury proteinů a jejich komplexů lze využít celou řadu metod, které však poskytují kvalitativně rozdílné informace. Výběr metody závisí především na charakteru daného proteinu nebo komplexu. V případě strukturovaných proteinů a jejich komplexů s jasně definovaným prostorovým uspořádáním jsou nejvhodnějšími volbami proteinová krystalografie, nukleární magnetická rezonance (NMR) a kryoelektronová mikroskopie (Cryo-EM). Výhodou metody NMR je získání struktury proteinu ve vodném roztoku, tedy za téměř nativních podmínek, nicméně metoda NMR je omezena pouze na molekuly s molekulovou hmotností do cca 70 kDa. Metoda Cryo-EM je naopak vhodná pro molekuly s molekulovou hmotností větší než cca 200 kDa. Problém s určováním struktury ovšem nastává v případě takových proteinů, jejichž prostorová struktura není nativně určena. Takovýmto proteinům se říká proteiny neuspořádané, nebo nesbalené, v anglicky psané literatuře se značí IDPs (z angl. *Intrinsically Disordered Proteins*). Tyto proteiny nejsou schopné tvořit krystaly a jejich NMR spektra jsou velmi obtížně interpretovatelná díky malému rozptylu signálů.

Protein fosducin, kterým se zabývá tato disertační práce, je typickým příkladem proteinu, jehož značná část vykazuje vlastnosti IDP. Ve volném (tzv. apo) stavu je tato část velmi flexibilní a neuspořádaná, nicméně po vazbě na vazebného partnera $G_i\beta\gamma$ transducinu se flexibilní část molekuly Pdc strukturuje a to dokonce tak, že komplex Pdc/ $G_i\beta\gamma$ byl úspěšně vykrytalizován [2]. Nicméně, při vazbě Pdc na jiného vazebného partnera, protein 14-3-3, ke strukturování flexibilní části nedochází. Komplexům, kde jeden z vazebných partnerů je IDP a po vazbě jím zůstává, se v anglické literatuře začalo říkat „fuzzy“ complexes (*fuzzy*, česky nejasný) [3].

Při studiu vlastností IDPs a „fuzzy“ komplexů lze využít několika biofyzikálních metod, díky kterým se dá alespoň přibližně určit jejich struktura. V současné době

neexistuje metoda, která by dokázala přesně popsat konformační chování takovýchto proteinů. Výsledkem těchto měření vždy bývá průměrná struktura, často zachycující nejčastěji se vyskytující konformaci proteinu. Mezi metody, které se používají ke studiu IDPs a „fuzzy“ komplexů, patří např. malouhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS, z angl. *Small-Angle X-Ray Scattering*), pomocí kterého lze získat strukturu s nízkým rozlišením. Ve spojení s NMR a metodami fluorescenční spektroskopie lze pak získat další upřesňující strukturní údaje. Pro charakterizaci sekundární struktury se využívá např. cirkulárního dichroismu (CD). Pro objasnění termodynamických vlastností komplexu lze využít isotermální titrační kalorimetrii (ITC) nebo analytickou ultracentrifugaci (AUC). Hydrodynamické vlastnosti objasňuje také AUC a dále dynamický rozptyl světla (DLS). K získání informací o vazebném povrchu lze využít např. metody výměny vodíku za deuterium spojené s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS). Informaci o změnách ve vnitřní neuspořádanosti proteinu lze získat i jeho kontrolovanou proteolýzou v přítomnosti a nepřítomnosti vazebného partnera. Existuje řada dalších technik, které jsou pro studium takovýchto proteinů využívány, ovšem výše zmíněné jsou pravděpodobně nejčastější. Většina z výše zmíněných technik byla využita ke studiu jak Pdc, tak jeho komplexu se 14-3-3. Na základě získaných dat byl vytvořen detailní strukturní model komplexu Pdc s proteinem 14-3-3 a navržen mechanismus, jakým protein 14-3-3 reguluje funkci Pdc v buňce.

2 Cíl práce

Hlavním cílem této disertační práce je strukturně charakterizovat protein fosducin (Pdc) a jeho komplex s proteinem 14-3-3 a na základě získaných dat objasnit úlohu proteinu 14-3-3 v regulaci funkce Pdc.

Dílčí cíle této práce jsou:

- Biofyzikálně charakterizovat N-terminální a C-terminální domény (Pdc-ND a Pdc-CD) Pdc. Stanovit jejich vazebné afinity k proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C.
- Zmapovat konformační změny molekuly Pdc vyvolané fosforylací na Ser54 a Ser73.
- Zmapovat vazebné rozhraní komplexu fosforylovaného fosducinu (Pdc-PP) s proteinem 14-3-3 $\zeta\Delta$ C.
- Strukturně charakterizovat volný Pdc a jeho komplex s proteinem 14-3-3 $\zeta\Delta$ C.
- Objasnit, zda vazba proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C ovlivňuje kinetiku defosforylace fosducinu *in vitro*.

3 Metody

K dosažení vytýčených cílů této práce bylo využito následujících biochemických a biofyzikálních metod:

- Exprese, purifikace a fosforylace proteinů
- Časově-rozlišené zhášení intenzity fluorescence
- Statické zhášení tryptofanové fluorescence
- Dynamický rozptyl světla (DLS)
- Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS)
- Nukleární magnetická rezonance (NMR)
- Analytická ultracentrifugace (AUC)
- Církulární dichroismus (CD)
- H/D výměna spojená s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS)
- Limitovaná proteolýza vizualizovaná na gelu po SDS-PAGE
- Limitovaná proteolýza spojená s hmotnostní spektrometrií
- Limitovaná defosforylace vizualizovaná na SDS-Phos-TagTM gelu
- Limitovaná defosforylace spojená s hmotnostní spektrometrií

4 Výsledky a diskuze

4.1 Biofyzikální a strukturní charakterizace fosducinu (Pdc)

Krystalová struktura komplexu Pdc s $G_{\beta}\gamma$ ukázala, že molekula Pdc obsahuje dvě domény: N-terminální (Pdc-ND, sekvence 1-107) a C-terminální (Pdc-CD, sekvence 114-246) domény [2, 4]. Tyto strukturní studie naznačily, že Pdc-ND je velmi flexibilní a ve volném stavu by mohla být neuspořádaná, tedy chovat se jako IDP (z angl. *Intrinsically Disordered Protein*). Pro ověření této hypotézy jsme provedli biofyzikální a strukturní charakterizaci obou domén pomocí řady biofyzikálních metod.

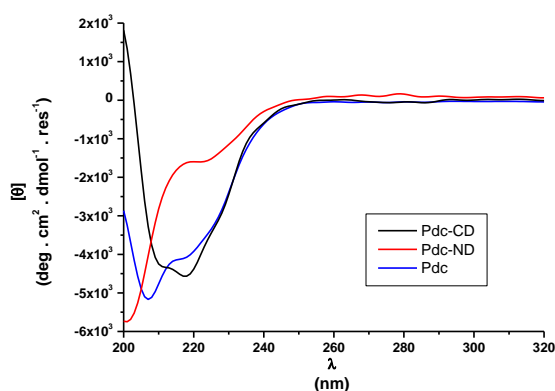
Byla charakterizována jak celá molekula Pdc, tak jeho jednotlivé domény samostatně (Pdc-ND, Pdc-CD). K charakterizaci obou domén byly zvoleny metody dynamického rozptylu světla (DLS) (Tabulka 4.1), cirkulárního dichroismu (CD) (Obr. 4.1), analytické ultracentrifugace (AUC) (Obr. 4.2 na str. 10), časově-rozlišeného zhášení intenzity fluorescence ANS a nukleární magnetické rezonance (NMR). Níže jsou zobrazeny vybrané výsledky.

Tabulka 4.1 Výsledky z měření fosducinu metodou DLS

	PdcQ52K	Pdc-ND	Pdc-CD
Počet residuí ^a	265	126	156
M_w ^b ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$)	30161,4	14643,2	17414,2
R_H (Å)	$38,4 \pm 0,5$	$35,4 \pm 0,4$	$26,0 \pm 0,1$

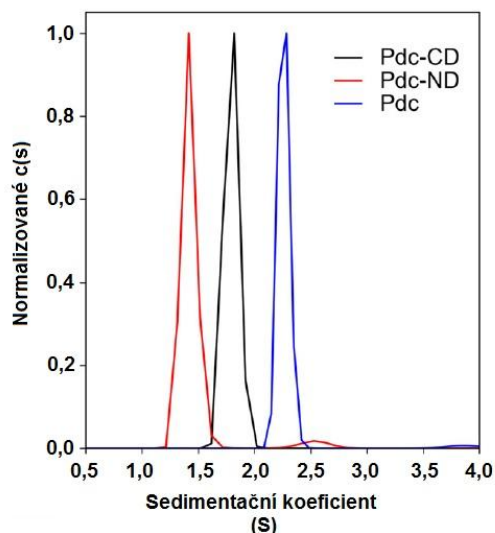
^aPočet residuí odpovídá proteinu spolu s $6 \times \text{His}$ kotvou bez prvního methioninu.

^bMolekulová hmotnost M_w vypočtená na základě aminokyselinové sekvence s obsahem $6 \times \text{His}$ kotvy.



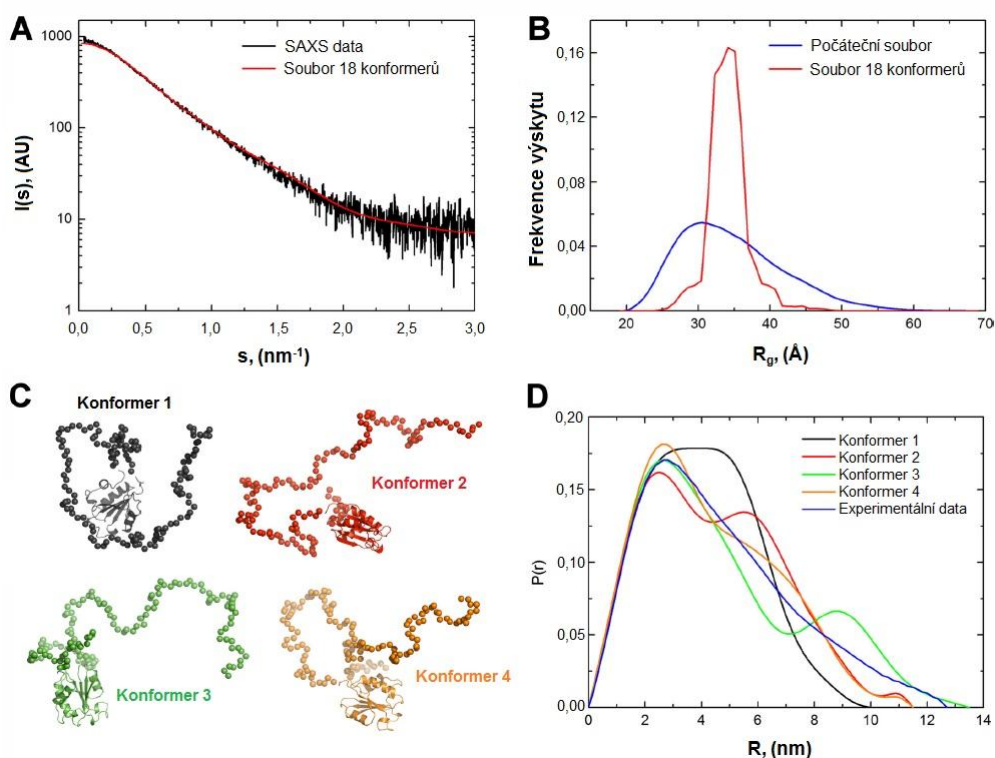
Obr. 4.1 Spektra cirkulárního dichroismu v daleké oblasti UV. Jedná se o závislost molární elipticity střední hodnoty residua $[\theta]$ na vlnové délce λ . Z křivek je patrné, že N-terminální doména fosducinu (Pdc-ND, aminokyseliny 1 - 107 s N-terminální $6 \times \text{His}$ kotvou, červená křivka) nevykazuje prvky sekundární struktury, naopak C-terminální doména fosducinu (Pdc-CD, aminokyseliny 110 - 246 s N-terminální $6 \times \text{His}$ kotvou, černá křivka) takovéto prvky vykazuje. Celá molekula PdcQ52K s N-terminální $6 \times \text{His}$ kotvou (modrá křivka) vykazuje prvky částečně uspořádaného proteinu.

Obr. 4.2 Normalizované spojité distribuce sedimentačního koeficientu získané metodou sedimentační rychlosti AUC proteinů Pdc, Pdc-ND a Pdc-CD o koncentracích $\sim 40\mu\text{M}$. Pdc-ND (červená) vykazuje nejnižší sedimentační koeficient, díky rozvolněné struktuře v roztoku. Pdc-CD (černá) vykazuje vyšší sedimentační koeficient, než Pdc-ND, díky kompaktnější struktuře, vykazující nižší tření. Nejvyšší sedimentační koeficient vykazuje Pdc (modrá), který, ač má také polovinu molekuly rozvolněnou, má nejvyšší molekulovou hmotnost.



Získané výsledky potvrzují, že Pdc-ND je vnitřně neuspořádaný protein (tzv. IDP) bez výrazných prvků sekundární a terciární struktury. Pdc-CD naopak vykazuje známky dobře sbaleného, strukturovaného proteinu. Jak je patrné z výsledků DLS (*Tabulka 4.1*, str. 9) a AUC (*Obr. 4.2*), majoritní podíl na vysoké hodnotě hydrodynamického poloměru R_H má právě Pdc-ND díky své neuspořádanosti a relativní flexibilitě.

Pomocí NMR probíhala charakterizace jak Pdc-CD, tak Pdc, tak i fosforylovaného Pdc (Pdc-PP) vázaného v komplexu s proteinem 14-3-3 (*Obr. 4.6*, str. 14). Struktura Pdc v roztoku byla dále charakterizována pomocí maloúhlového rozptylu rentgenového záření (SAXS, z angl. *Small-Angle X-Ray Scattering*). Z důvodu neuspořádanosti Pdc byla pro analýzu dat zvolena metoda EOM (z angl. *Ensemble Optimization Method*) [5]. Metoda umožňuje získat přibližný model neuspořádaného proteinu, v tomto případě molekuly Pdc. *Obr. 4.3A* na str. 11 zobrazuje naměřená rozptylová data (černá linie) proložená modelovou křivkou získanou metodou EOM (červená křivka). Tato červená křivka odpovídá průměru osmnácti EOM vybraných konformerů (*Obr. 4.3B*), jejichž simulovaná rozptylová data nejlépe odpovídají datům naměřeným. *Obr. 4.3C* zobrazuje čtyři možné konformery volného Pdc v roztoku. Jak je patrné z *Obr. 4.3D*, žádný konformer samostatně přesně nepřekrývá křivku rozptylových dat.



Obr. 4.3 EOM analýza SAXS dat měřených na Pdc o koncentraci $4,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. (A) Graf závislosti rozptylové intenzity $I(s)$ na rozptylovém úhlu s zobrazuje srovnání získaných rozptylových dat (černá křivka) s teoretickou rozptylovou křivkou 18 konformerů Pdc, získanou metodou EOM (červená křivka). Obě křivky se dobře překrývají, čemuž odpovídá i hodnota $\chi^2 = 0,98$. (B) Graf závislosti frekvence výskytu gyračních poloměrů R_g možných konformerů Pdc na hodnotě R_g . Modrá křivka odpovídá počátečnímu souboru (10 000) konformerů daných primární aminokyselinovou sekvencí, červená křivka odpovídá souboru (18) konformerů vybraných metodou EOM tak, aby průměr teoretických rozptylových křivek těchto konformerů nejlépe odpovídal naměřeným datům. (C) Ukázka čtyř reprezentativních trojrozměrných struktur Pdc vybraných ze souboru 18 konformerů. Část s dobře definovanými prvky sekundární struktury představuje Pdc-CD, rozvolněný řetězec pak Pdc-ND. (D) Zobrazení párové distribuční funkce $P(r)$ pro čtyři jednotlivé konformery z části (C). Z grafu je patrné, že žádný z konformerů samostatně nedokáže ideálně reprezentovat naměřená data, pouze jejich průměr se naměřeným datům blíží.

4.2 Biofyzikální a strukturní charakterizace Pdc-PP a 14-3-3/Pdc-PP

Několik studií ukázalo [6, 7], že Pdc je vázán v sítnici oka proteinem 14-3-3 a k vazbě jsou potřebná dvě fosforylační místa obsažená v Pdc (Ser54 a Ser73). Tato domněnka byla námi potvrzena pomocí metody AUC – sedimentační rychlosti. Dále bylo stejnou metodou ukázáno, že stechiometrie komplexu 14-3-3:Pdc-PP je 2:1, tedy dimer proteinu 14-3-3 váže jednu molekulu Pdc. Následně jsme ukázali, že největší podíl na vazbě má fosforylovaná Pdc-ND, kdy disociační konstanta tohoto komplexu získaná metodou AUC – sedimentační rychlostí dosáhla hodnoty $K_d \sim 3 \text{ } \mu\text{M}$. Hodnota K_d

komplexu 14-3-3:Pdc-PP ovšem dosáhla hodnoty $\sim 7 \mu\text{M}$, což poukazuje na fakt, že Pdc-ND se nejvíce podílí na vazbě se 14-3-3 a Pdc-CD vazbu mírně oslabuje.

Výsledky získané metodou DLS ukazují, že ač je molekulová hmotnost 14-3-3 dvojnásobná ve srovnání s Pdc, jeho hodnota R_H je srovnatelná, což nasvědčuje faktu, že Pdc je velmi rozvolněná molekula (*Tabulka 4.2*). Z *Tabulky 4.2* je také patrné, že po vzniku komplexu 14-3-3/Pdc-PP hodnota R_H příliš nevzrostla ve srovnání se samotnými proteiny. Tento jev může poukazovat na fakt, že rozvolněná Pdc-ND je zanořena do centrálního kanálu dimeru 14-3-3.

Tabulka 4.2 Hydrodynamické poloměry R_H proteinů měřených metodou DLS

	14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$	PdcQ52K	PdcQ52K-PP	14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ + PdcQ52K	14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ + PdcQ52K-PP
$R_{H,DLS}^a$ (Å)	$36,6 \pm 0,5$	$37,4 \pm 0,3$	$38,2 \pm 0,5$	$36,9 \pm 0,1$	$44,2 \pm 0,6$
$R_{H,teor.}^b$ (Å)	25,4	20,6	20,6	-	29,3
M_w^c ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$)	$56896,0^d$	$30161,4^e$	$30161,4^e$	-	$87021,5^f$

^aHydrodynamické poloměry získané měřením DLS. Hodnoty odpovídají střední hodnotě \pm směrodatná odchylka z pěti měření.

^bHydrodynamické poloměry získané teoretickým výpočtem rigidního sférického dehydratovaného proteinu získaného z rovnice $R_H[\text{protein}] = 66 \cdot 10^{-12} \cdot M_w^{1/3}$, kde M_w je molekulová hmotnost ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$) [8].

^cMolekulová hmotnost M_w vypočtená na základě aminokyselinové sekvence s obsahem $6 \times$ His kotvy.

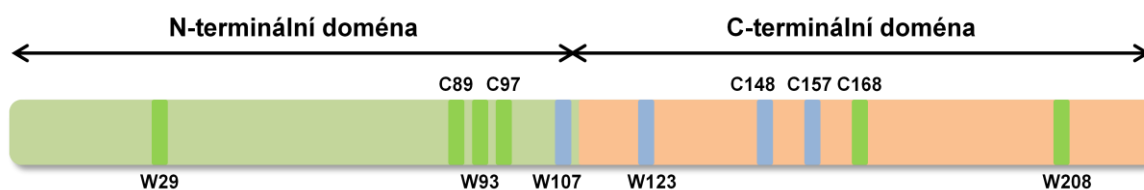
^dMolekulová hmotnost dimeru 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ obsahujícího dvě N-terminální $6 \times$ His kotvy.

^eMolekulová hmotnost bez prvního methioninu obsaženého v $6 \times$ His kotvě.

^fMolekulová hmotnost bez prvního methioninu obsaženého v $6 \times$ His kotvě PdcQ52K, a dimeru 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ obsahujícího dvě N-terminální $6 \times$ His kotvy.

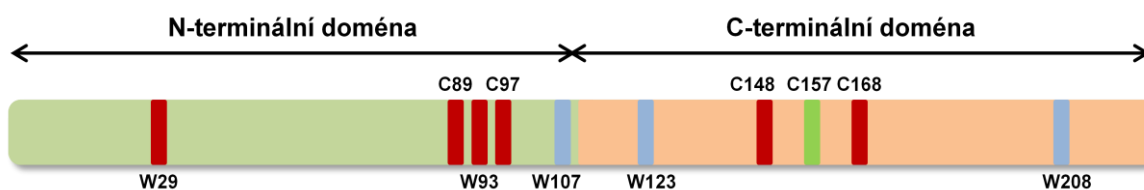
Dále byl zkoumán vliv fosforylace Pdc na jeho strukturu a flexibilitu a vliv vazby 14-3-3 na strukturu a flexibilitu Pdc-PP pomocí časově-rozlišeného zhášení tryptofanové fluorescence a fluorescence fluorescenční značky AEDANS, kovalentně vázané na cysteinových zbytcích obsažených v Pdc. Na stejných vzorcích byl měřen i časově-rozlišený pokles anizotropie fluorescence, který poskytl informace o flexibilitě Pdc po jeho fosforylaci a vazbě se 14-3-3. Vždy byly měřeny vzorky Pdc obsahující pouze jeden tryptofanový, nebo cysteinový zbytek. Jelikož Pdc-WT (nativně vyskytující se Pdc) obsahuje pouze jeden tryptofanový zbytek (W29), byly vyrobeny mutantní formy Pdc s obsahem tryptofanových zbytků v jiných pozicích. Pdc-WT obsahuje pět cysteinových zbytků, kde dva se nacházejí v Pdc-ND a tři v Pdc-CD, proto bylo potřeba připravit mutantní formy obsahující vždy po jednom cysteinovém zbytku. *Obr. 4.4* na str. 13 zobrazuje, shrnutí výsledků z těchto měření se zaměřením na vazbu proteinu 14-3-3. Obrázek zobrazuje, u kterých fluoroforů obsažených v molekule PdcQ52K a mutantních forem, došlo po vazbě proteinu 14-3-3 ke zvýšení (zelené pruhy) střední doby života

excitovaného stavu τ_{mean} . Zvýšená hodnota τ_{mean} naznačuje přímý fyzický kontakt Pdc-PP se 14-3-3.



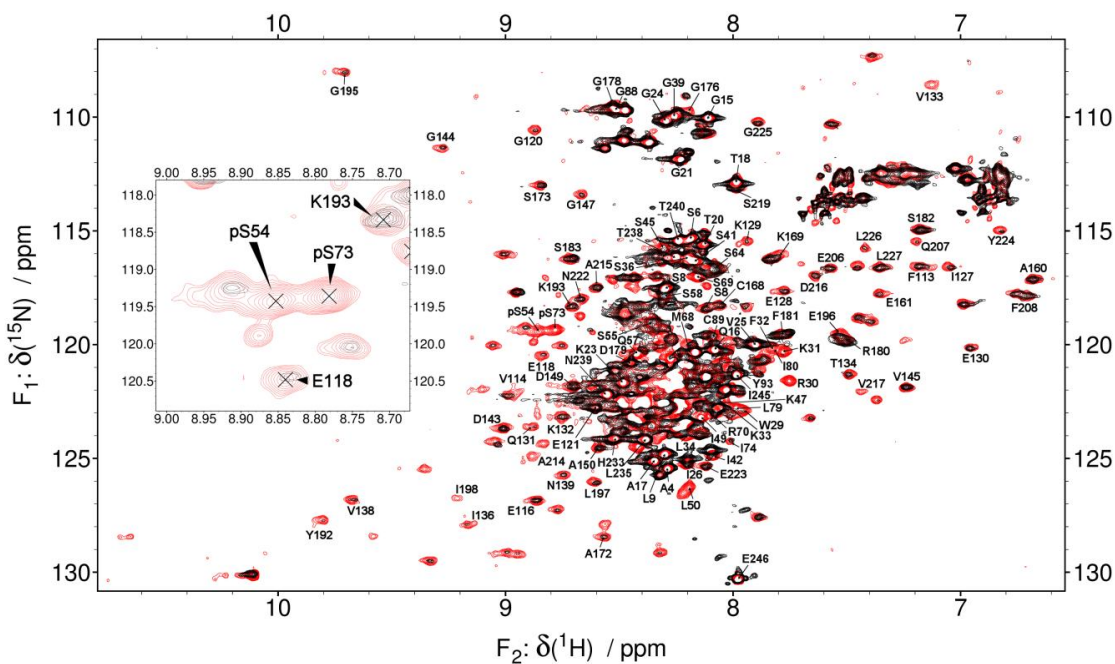
Obr. 4.4 Schematické znázornění molekuly fosducinu s vyznačenými pozicemi fluoroforů, u kterých došlo po vazbě proteinu 14-3-3 ke zvýšení střední doby života excitovaného stavu τ_{mean} (zelené pruhy). Modré pruhy odpovídají pozicím fluoroforů, u kterých došlo k minimální, nebo žádné změně τ_{mean} po vazbě 14-3-3.

Obr. 4.5 zobrazuje, u kterých fluoroforů obsažených v molekule PdcQ52K a jeho mutantních forem došlo po vazbě proteinu 14-3-3 ke zvýšení (zelené pruhy), nebo snížení (červené pruhy) pohyblivosti dané buď změnou hodnoty β_{short} , nebo změnou hodnoty β_3 . Zvýšená pohyblivost rychlých lokálních pohybů odpovídá zvýšení hodnoty β_{short} . Zvýšená rotační difuze celé molekuly odpovídá snížení hodnoty β_3 .



Obr. 4.5 Schematické znázornění molekuly fosducinu s vyznačenými pozicemi fluoroforů, u kterých došlo po vazbě proteinu 14-3-3 ke zvýšení (zelené pruhy) nebo snížení (rudé pruhy) flexibility. Modré pruhy odpovídají pozicím fluoroforů, u kterých došlo k minimální, nebo žádné změně flexibility po vazbě 14-3-3.

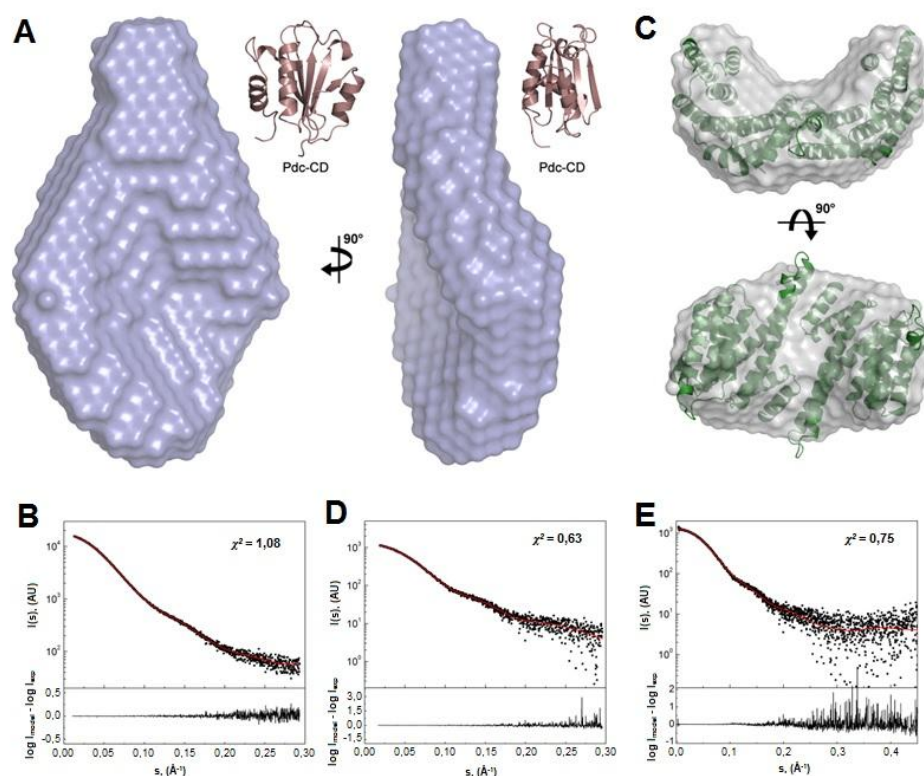
Komplex 14-3-3/Pdc-PP i samotný Pdc byl dále zkoumán metodou NMR. Bylo získáno 2D NMR ^1H - ^{15}N TROSY spektrum izotopově značeného Pdc v komplexu (červená) i samotného Pdc (černá) a tato spektra byla porovnána (Obr. 4.6, str. 14). Po fosforylaci a vazbě 14-3-3 došlo k vymizení signálu obou fosforylovaných serinů (Ser54, Ser73), což nasvědčuje faktu, že oba seriny se účastní vazby a jsou v přímém kontaktu se 14-3-3. Získané spektrum také ukazuje, že Pdc-ND je IDP s typickými signály mezi 8 a 9 ppm, které vykazují neuspořádané proteiny. Tato oblast také obsahuje signály z neuspořádaného C-konce Pdc-CD, což potvrzuje bioinformatická analýza [9].



Obr. 4.6 ^1H - ^{15}N TROSY spektrum Pdc-PP v nepřítomnosti (černá) a přítomnosti (červená) 14-3-3 ζ AC (molární poměr 14-3-3 ζ AC:Pdc-PP = 2:1). Pro přehlednost nejsou popsány všechny signály ve střední části spektra. Vložený graf ukazuje přibližný pohled na signály obou fosforylovaných serinů (Ser 54 a Ser 73).

K mapování vazebného povrchu mezi Pdc-PP a 14-3-3 byla využita metoda H/D výměny spojené s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS). Metoda sleduje kinetiku deuterace amidických vodíků obsažených v proteinech. Výsledky naznačují, že se jedná o transientní interakci, čili na molekule Pdc nebyla pozorována výrazná deuterace měřená v čase po vazbě na 14-3-3. Změna kinetiky deuterace v čase byla ovšem pozorována na peptidech obsažených v molekule 14-3-3, přičemž deuterované oblasti zahrnují peptidy, nacházející se jak v centrálním kanálu dimeru 14-3-3, tak ve vnějších oblastech dimeru 14-3-3. Tyto oblasti jsou tedy pravděpodobně zapojeny do interakce s Pdc-PP.

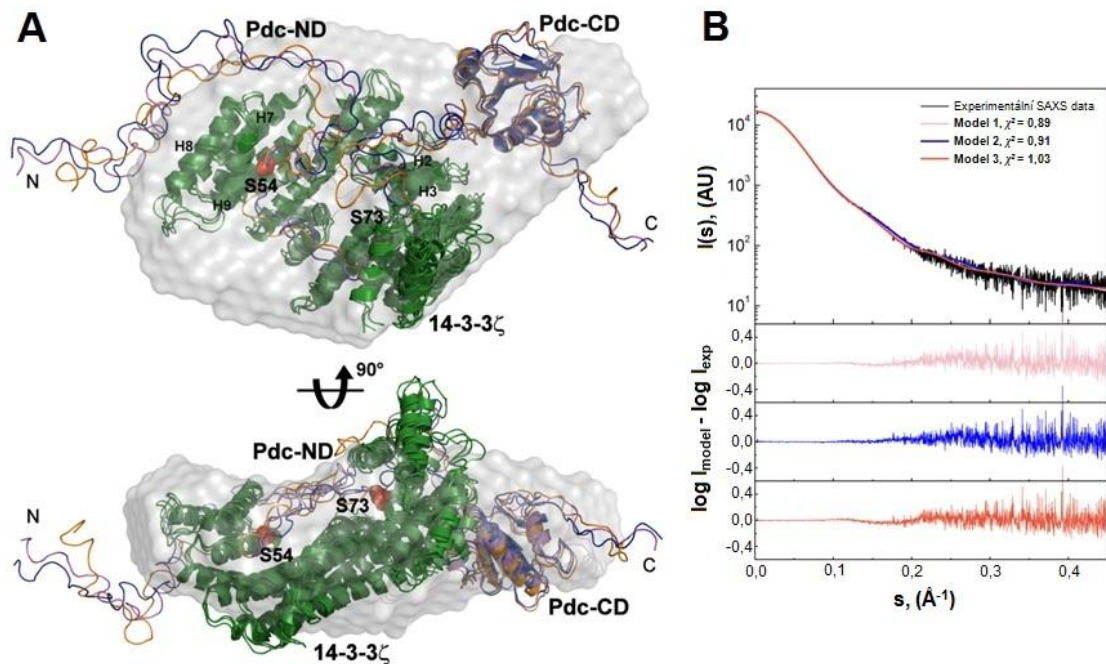
K získání modelu komplexu s nízkým rozlišením byla využita metoda SAXS. Obr. 4.7 na str. 15 zobrazuje výsledky získané touto metodou. Obr. 4.7A zobrazuje obálku komplexu 14-3-3/Pdc-PP. Vrchní část obrázku představuje vyčnívající Pdc-CD. Pdc-ND je zanořena do vnitřního kanálu dimerního 14-3-3. Obr. 4.7C zobrazuje obálku proteinu 14-3-3 s vnořenou strukturou získanou krystalograficky [11]. Na základě dat získaných metodou SAXS bylo provedeno tzv. „All-atom“ modelování pomocí metody AllosMod-FoXS [14, 15]. Touto metodou byl získán přibližný model komplexu, jak je ukázáno na Obr. 4.8 na str. 16.



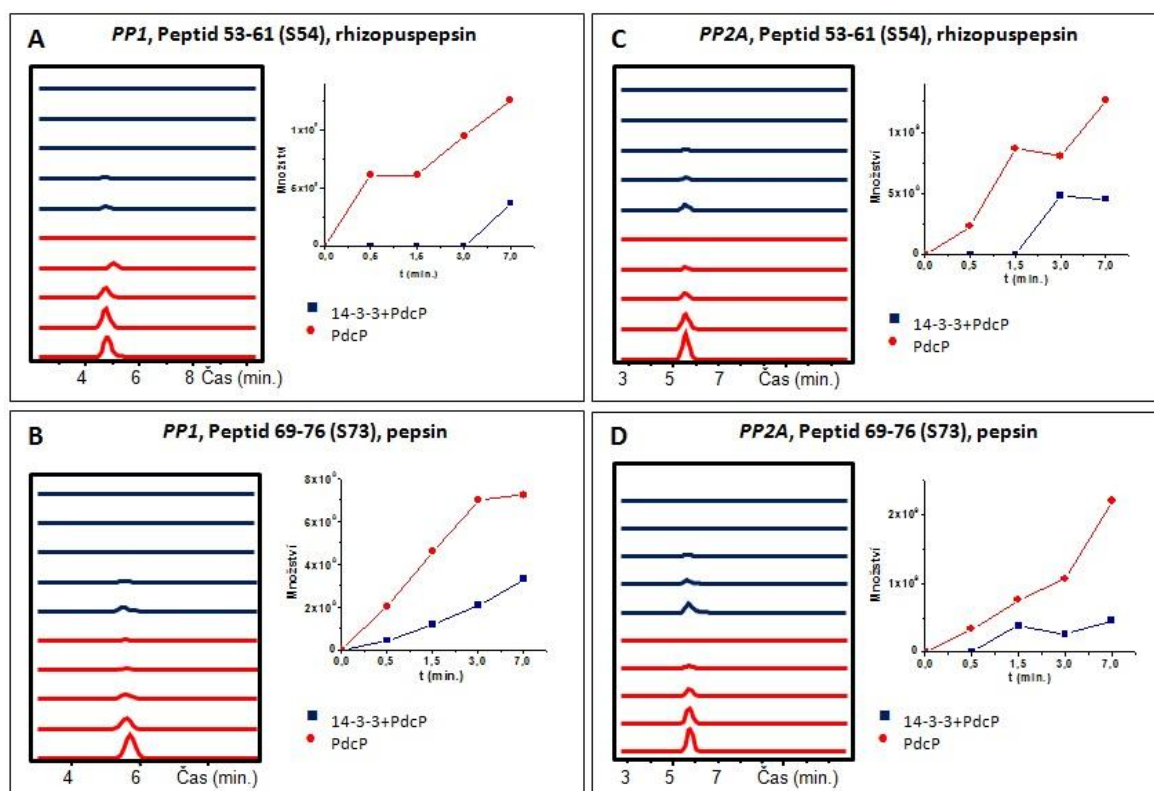
Obr. 4.7 *Ab initio* rekonstrukce obálky měřených proteinů. (A) Šedá obálka komplexu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C:PdcQ52K-PP smíchaných v molárním poměru 2:1, získaná výpočtem ze SAXS dat, pro vzorek o koncentraci 5,6 mg · ml⁻¹. (B) Srovnání rozptylových dat pro komplex s koncentrací 5,6 mg · ml⁻¹ (černá) s proloženým *ab initio* modelem získaným programem DAMMIF [10] (červená). (C) Šedá obálka 14-3-3 $\zeta\Delta$ C získaná výpočtem ze SAXS dat, pro vzorek o koncentraci 4,3 mg · ml⁻¹, s vloženou krystalovou strukturou 14-3-3 ζ (PDB: 1QJA, [11]). (D) Srovnání rozptylových dat 14-3-3 $\zeta\Delta$ C o koncentraci 4,3 mg · ml⁻¹ (černá) s proloženým *ab initio* modelem získaným programem DAMMIF (červená). (E) Srovnání spočítané teoretické rozptylové křivky (červená) krystalové struktury 14-3-3 ζ [11] s experimentálními rozptylovými daty. Statistické údaje příslušející *ab initio* rekonstrukci obálky jsou shrnuty v Tabulce 5.13. DAMMIF *ab initio* model 14-3-3 $\zeta\Delta$ C obklopující krystalovou strukturou 14-3-3 ζ byl vytvořen pomocí programu SUPCOMB [12]. Teoretická rozptylová křivka proteinu 14-3-3 ζ byla získána za využití programu CRY SOL [13].

Jak je patrné z výše uvedených dat, Pdc-ND se nachází v centrálním kanálu dimeru 14-3-3, což vede k obklopení většiny sekvence Pdc, která se podílí na vazbě Pdc s G β γ transducinu. Vazba 14-3-3 tedy fyzicky brání tvorbě komplexu Pdc/G β γ .

Bylo spekulováno, že vazba 14-3-3 na Pdc-PP by mohla vést ke zpomalení defosforylace Pdc-PP [7]. Bylo dokázáno, že fosforylovaný Pdc je v buňce defosforylován pomocí dvou fosfatů: proteinfosfatou 1 (PP1) a proteinfosfatou 2A (PP2A) [17, 18]. Tato myšlenka byla námi ověřena *in vitro* metodou limitované defosforylace spojené s hmotnostní spektrometrií (Obr. 4.9 na str. 17).



Obr. 4.8 All-atom modelování komplexu 14-3-3 ζ /Pdc-PP. (A) Tři modely komplexu spočítané s použitím serveru AllosMod-FoXS [14, 15], které nejlépe odpovídají naměřeným rozptylovým SAXS datům. 14-3-3 ζ je zobrazen zeleně, Pdc-PP fialově (Model 1), modře (Model 2) a oranžově (Model 3). AllosMod modely jsou vneseny do DAMMIF ab initio obálky (šedá) spočítané ze SAXS dat pro komplex o koncentraci $5,6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. (B) Srovnání spočítaných rozptylových křivek pro tři nejlepší modely komplexu (fialová, modrá a oranžová) s experimentálními rozptylovými daty komplexu o koncentraci $5,6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (černá linie). Teoretické rozptylové křivky byly spočítány a prokládány experimentálními daty za použití programu FoXS [16]. DAMMIF ab initio model komplexu a jeho AllosMod modely byly sloučeny pomocí programu SUPCOMB [12].



Obr. 4.9 Vizualizace kinetiky defosforylace PdcQ52K-PP (značeno PdcP) z výsledků získaných metodou LC-MS. Levé části obrázků (**A**, **B**, **C**, **D**) představují chromatogramy odpovídající konkrétnímu kladně nabitému peptidu vzniklému proteolýzou (pepsin, nebo rhizopuspepsin) defosforylujícího fosducinu. Nejvýše umístěný chromatogram dané barvy (modrá nebo červená) v černém rámečku odpovídá peptidu po 0 minutovém působení fosfatasy (PP1, nebo PP2A). Nejnižší umístěný chromatogram dané barvy odpovídá 7 minutovému působení fosfatasy. Grafy vpravo (**A**, **B**, **C**, **D**) zobrazují kinetiku defosforylace. Každý bod odpovídá určitému množství peptidu detekovanému hmotnostním spektrometrem v odpovídajícím čase zastavení defosforylace. Tyto výsledky jsou zobrazeny pro čtyři vybrané peptidy obsahující fosforylační místa PdcQ52K, Ser54 a Ser73. Pokusy byly provedeny pro PdcP v přítomnosti (molární poměr 2:1) i nepřítomnosti 14-3-3 ζ AC (značeno 14-3-3).

Závěrem lze tedy říci, že se podařilo charakterizovat strukturu Pdc jak ve volném stavu, tak i v komplexu s proteinem 14-3-3. Na základě získaných strukturních dat byl navržen mechanismus, kterým protein 14-3-3 inhibuje interakci Pdc s $G_i\beta\gamma$. Dále bylo ukázáno, že další možnou funkcí vazby proteinu 14-3-3 může být zpomalení defosforylace Pdc-PP fyzickým bráněním přístupu fosfatasy PP1 a PP2A.

5 Závěr

V rámci této disertační práce byla zkoumána struktura Pdc a jeho komplexu s proteinem 14-3-3. Ke studiu struktury bylo použito řady biofyzikálních a biochemických metod. Dále byl zkoumán vliv vazby 14-3-3 na kinetiku defosforylace fosforylovaného Pdc.

Tato práce přinesla následující konkrétní výsledky:

- Pdc-ND je vnitřně neuspořádaný protein (IDP) a v roztoku nevykazuje prvky sekundární ani terciární struktury. Pdc-CD je vnitřně uspořádaná a vykazuje prvky jak sekundární, tak terciární struktury.
- Vazebná afinita fosforylované Pdc-ND k proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C je vyšší ($K_d \sim 3 \mu\text{M}$), než afinita celého fosforylovaného Pdc k 14-3-3 $\zeta\Delta$ C ($K_d \sim 7 \mu\text{M}$). Vazebná afinita Pdc-CD k 14-3-3 $\zeta\Delta$ C nebyla pozorována ($K_d > 500 \mu\text{M}$). Z těchto výsledků vyplývá, že pro tvorbu komplexu je klíčová fosforylovaná Pdc-ND.
- Fosforylace Pdc vyvolává strukturální změny a změny ve flexibilitě, a to zejména v Pdc-ND. Výsledky také naznačují, že u volného Pdc-PP fosforylovaná Pdc-ND interaguje s Pdc-CD.
- Obě fosforylační místa Pdc (Ser54 a Ser73) jsou klíčová pro vazbu proteinu 14-3-3. Velká část Pdc-ND, která tvoří většinu vazebného povrchu Pdc pro $G_t\beta$, se v komplexu se 14-3-3 nachází buď v centrálním kanálu molekuly dimeru 14-3-3, nebo v blízkosti jeho povrchu. Vazba 14-3-3 tedy blokuje vazebný povrch Pdc pro $G_t\beta$ a tím inhibuje tuto interakci. NMR a HDX-MS měření ukázala, že Pdc-PP zůstává i po navázání na protein 14-3-3 flexibilní, což naznačuje, že by se mohlo jednat o tzv. „fuzzy“ komplex.
- Vazba proteinu 14-3-3 $\zeta\Delta$ C zpomaluje defosforylací Pdc-PP pomocí PP1 a PP2A *in vitro*.

Curriculum vitae

Osobní údaje

Miroslava Kacířová, narozena 1987, svobodná, bydliště Třinec

Vzdělání

2011 – doposud Univerzita Karlova v Praze, PřF, Fyzikální chemie, Doktorské studium
2009 – 2011 Univerzita Karlova v Praze, PřF, Biofyzikální chemie, Magisterské studium
2006 – 2009 Univerzita Karlova v Praze, PřF, Biochemie, Bakalářské studium

Zaměstnání

2009 – 2016 Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Oddělení proteinových struktur
2012 – doposud Univerzita Karlova v Praze, PřF, Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Zkušenosti s experimentálními metodami a softwarem

- klonování, cílená mutagenese, exprese a purifikace proteinů (sonikace, chromatografie, SDS-PAGE), izotopové značení proteinů pro NMR studie, fosforylace proteinů pomocí PKA, fluorescenční techniky, DLS, CD, AUC, NMR, hmotnostní spektrometrie (MS), H/D výměna spojená s MS, ITC, SAXS, MST, limitovaná proteolýza, limitovaná defosforylace, příprava Phos-TagTM gelů, nativní elektroforéza
- MS Office; Zoner Callisto; ChemSketch; Origin; PyMOL; DataAnalysis 4.2; GPMW 8.0; Sparky; BioEdit; NanoAnalyse 3.6.0

Výuka

Cvičení: Obecná a fyzikální chemie, Biofyzikální chemie na PřF UK v Praze

Absolvované kurzy

- Seminář Moderní problémy NMR spektroskopie, Pec pod Sněžkou, 14. – 19. 11. 2010.
- Circular and Linear Dichroism Workshop, Warwick, England, Sep 9-11, 2013.
- Seminář Moderní problémy NMR spektroskopie, Pec pod Sněžkou, 3. – 8. 11. 2013.
- The 1st FEBS-Instruct crystallization course in the middle EU: Advanced methods in macromolecular crystallization VI, Nové Hrady, Jun 20-27, 2014. Získán RIGAKU grant.

Příspěvky na konferencích ve formě přednášek

- Kacířová, M., Rezabkova, L., Sulc, M., Herman, P., Vecer, J., Stepanek, M., Obsilova, V., Obsil, T.: *Structural basis of the 14-3-3 protein-dependent regulation of fosducin*, 10th Discussions in Structural Molecular Biology, Nové Hrady, March 22-24, 2012. Abstract v *Materials Structure*, 19 (1), 21 (2012).
- Kacířová, M., Řežábková, L., Kádek, A., Man, P., Nováček, J., Večeř, J., Štěpánek, M., Obšilová, V., Obšil, T.: *Biofyzikální charakterizace fosducinu a jeho komplexu s vazebným partnerem – proteinem 14-3-3*, XIV Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků, Milovy, 13. - 16. 5. 2014. Abstrakt v *Chemických listech*, 108, 519-560 (2014).
- Kacířová, M., Kádek, A., Man, P., Nováček, J., Obšilová, V., Obšil, T.: *Strukturní studie proteinového komplexu 14-3-3/Pdc*, XV Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků, Milovy, 12. - 15. 5. 2015. Abstrakt v *Czech Chem. Soc. Symp. Ser.*, 13, 16 (2015).

Navštívené konference s prezentací posteru

- L. Rezabkova, M. Kacířová, P. Herman, J. Vecer, M. Sulc, T. Obsil: *Biophysical characterization of fosducin/14-3-3 protein complex*, 8th Discussions in Structural Molecular Biology, Nové Hrady, March 18-20, 2010. Abstract v *Materials Structure*, 17 (1a), 49 (2010).
- M. Kacířová, L. Rezabkova, P. Herman, J. Vecer, M. Sulc, T. Obsil: *Structural studies of 14-3-3/fosducin complex*, 9th Discussions in Structural Molecular Biology, Nové Hrady, March 24-26, 2011. Abstract v *Materials Structure*, 18 (1), 47 (2011).

- M. Kacirova, P. Man, A. Kadek, T. Obsil: *Mapping of the interaction surface of phosducin using HDX-MS*, 11th Discussions in Structural Molecular Biology, Nové Hradky, March 14-16, 2013. Abstract v *Materials Structure*, 20 (1), 29 (2013).
- M. Kacirova, P. Man, A. Kadek, T. Obsil: *Structural studies on Pdc/14-3-3 protein komplex*, 12th Discussions in Structural Molecular Biology, Nové Hradky, March 13-15, 2014. Abstract v *Materials Structure*, 21 (1), 36 (2014).
- M. Kacirova, J. Novacek, A. Kadek, P. Man, V. Obsilova, T. Obsil: *Structural characterization of phosphoprotein phosducin and its interaction with 14-3-3*, 13th Discussions in Structural Molecular Biology, Nové Hradky, March 19-21, 2015. Abstract v *Materials Structure*, 22 (1), 40 (2015).
- Kacirova, M., Rezaczkova, L., Herman, P., Vecer, J., Sulc, M., Obsil, T.: *Biophysical characterization of interactions between the 14-3-3 protein and phosphorylated phosducin*, 36th FEBS Congress of the Biochemistry for Tomorrows Medicine, Torino, Italy, Jun 25-30, 2011. Abstract v *FEBS Journal*, 278, 111-112 (2011).
- M. Kacirova, L. Rezaczkova, P. Herman, J. Vecer, M. Sulc, V. Obsilova, T. Obsil: *The 14-3-3 protein binding affects the conformation of both the N- and C-terminal domains of phosducin*, 22nd IUBMB & 37th FEBS Congress, From Single Molecules to Systems Biology, Sevilla, Spain, Sep 4-9, 2012. Abstract v *FEBS Journal*, 279, s1, 450 (2012).
- M. Kacirova, J. Novacek, L. Zidek, V. Obsilova, T. Obsil: *Investigation into Pdc behavior upon 14-3-3 binding using NMR, SAXS and Trp fluorescence quenching techniques*, 38th FEBS-EMBO Congress, Paris, France, Aug 30 - Sep 4, 2014. Abstract v *FEBS Journal*, 281, 287 (2014).
- M. Kacirova, L. Rezaczkova, P. Herman, J. Vecer, M. Sulc, M. Stepanek, V. Obsilova, T. Obsil: *Regulatory mechanism of phosducin function*, 4th EuCheMS Chemistry Congress, Prague, Aug 26-30, 2012.
- M. Kacirova: *The Mechanism of the regulation of phosducin function*, International Circular Dichroism User Group Meeting, Warwick, England, Sep 9, 2013.
- Kacirova, M., Novacek, J., Kadek, A., Man, P., Obsilova, V., Obsil, T.: *Biophysical characterization of phosducin and its komplex with 14-3-3 protein*, The 29th Annual Symposium of The Protein Society Barcelona, Španělsko, Jul 22-25, 2015. Abstract v Abstract Book dostupný na http://www.barcelocongresos.com.es/protein2015/images/book_abstracts.pdf (září 2016), str. 214

Publikace

- Rezaczkova, L., Kacirova, M., Sulc, M., Herman, P., Vecer, J., Stepanek, M., Obsilova, V., Obsil, T.: *Structural modulation of phosducin by phosphorylation and 14-3-3 protein binding*. ***Biophys. J.***, 103, 1960 – 1989 (2012).
- V. Obsilova, M. Kopecka, D. Kosek, M. Kacirova, S. Kylarova, L. Rezaczkova, T. Obsil: *Mechanisms of the 14-3-3 protein function: regulation of protein function through conformational modulation*. ***Physiol. Res.***, 63, S155 – S164 (2014).
- 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.***, 290, 16246 – 16260 (2015).

Rukopis v recenzním řízení

- Kacirova, M., Novacek, J., Man, P., Obsilova, V., Obsil, T.: *Structural Basis for Regulation of Phosducin Function by 14-3-3 Protein*

Podíl na grantech

- GAČR, projekt číslo P305/11/0708, spoluřešitel
- GAUK, projekt číslo 28510, 2010 – 2013, spoluředitel
- GAUK, projekt číslo 793913, 2013 – 2015, hlavní řešitel

Jazykové znalosti

- čeština (rodilý mluvčí), angličtina (B2), němčina (A1), slovenština (hovorově), polština (hovorově)

Abstract

This dissertation is focused on 30 kDa protein phosphodiesterase (Pdc) and on the regulation of its function through the interaction with 28 kDa adaptor protein 14-3-3. These two proteins participate in G-protein signal transduction pathways, especially in the process of light signal transduction. It is assumed that Pdc binds to the $G_t\beta\gamma$ complex of G-protein called transducin and through this interaction it inhibits the reassociation of $G_t\beta\gamma$ with $G_t\alpha$ thus reducing the visual signal transfer. This process is thought to participate in a long-term light adaptation. The regulation of Pdc function is further regulated by its phosphorylation and subsequent binding to the 14-3-3 protein. It has been speculated that the 14-3-3 binding plays a key role in the inhibition of the interaction between phosphorylated Pdc (Pdc-PP) and $G_t\beta\gamma$. The formation of the 14-3-3/Pdc-PP complex leads to the reassociation of $G_t\beta\gamma$ with $G_t\alpha$ and consequently to the amplification of visual signal transfer. Nevertheless, the mechanism by which the 14-3-3 protein binding inhibits the interaction between Pdc and $G_t\beta\gamma$ remains elusive.

The main aims of this dissertation were: (i) to investigate the structure of Pdc in its apo-state (in the absence of the binding partner) and in the complex with 14-3-3, and (ii) to suggest the mechanism of the 14-3-3-mediated regulation of Pdc function. The structure of Pdc and the 14-3-3/Pdc-PP complex was studied using various biophysical methods including small-angle X-ray scattering (SAXS), NMR, H/D exchange coupled to mass spectrometry (HDX-MS) and fluorescence techniques. Our data suggested that the N-terminal domain of Pdc (Pdc-ND) is intrinsically disordered protein. The phosphorylation of Pdc affects conformation of both its domains - unstructured Pdc-ND as well as structured C-terminal domain (Pdc-CD). The 14-3-3 protein binds Pdc-PP with the binding affinity in micromolar range and the complex formation affects the conformation of Pdc especially within Pdc-ND. Both phosphorylation sites are essential for the complex formation. The majority of Pdc-ND, which accounts for the most of the $G_t\beta$ binding surface, is located either in the central channel of the 14-3-3 dimer or in the close vicinity of the 14-3-3 outer surface. Therefore, our data suggest that the 14-3-3 binding masks the majority of the $G_t\beta$ binding surface of Pdc and thus inhibits its interaction with $G_t\beta$. In addition, NMR and HDX-MS measurements revealed that Pdc-PP remains highly flexible after the 14-3-3 binding, which indicates the formation of a “fuzzy” complex. Our data also showed that the 14-3-3 binding slows down dephosphorylation of Pdc-PP *in vitro*.

1 Introduction

This thesis focuses on structural study of phosphodiesterase-4 (Pde) and its complex with the scaffolding protein 14-3-3. The structure of the complex has not been resolved yet. The main motivation of this project is to understand the regulation of Pde function through the interaction with 14-3-3. The structural information is an important tool for the understanding of the protein and its complexes function. This thesis is a part of a long-term project supervised by prof. Tomáš Obšil, Ph.D. from Charles University in Prague, Faculty of Science and it is a sequel to my diploma thesis [1].

Proteins and their complexes can be studied using different biophysical and biochemical methods that provide qualitatively different information. The method is chosen depending on the character of the protein or the complex. The best choices for structured proteins are the X-ray crystallography, the nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and the cryo-electron microscopy (Cryo-EM). The NMR provides the structure of the protein under almost native conditions but using of NMR is limited to ca. 70 kDa proteins. Cryo-EM is limited to ca. 200 kDa proteins at least. There is a problem with unstructured proteins which are called Intrinsically Disordered Proteins (IDPs). These proteins cannot form crystals and their NMR spectra are badly interpretable because of narrow dispersion of signals.

The large part of Pde molecule shows characteristics of IDP. In its free-state (apo-state) this part is flexible and unstructured. When Pde is bound to its binding partner, $G_i\beta\gamma$ subunits of transducin, the flexible part becomes structured [2]. Nevertheless, the binding of another binding partner of Pde, protein 14-3-3, does not lead to structuralization of the unstructured part of Pde. Such complexes are called “fuzzy” [3].

To get an approximate structure of IDPs and fuzzy complexes, several biophysical methods can be used. Currently, no method is available to precisely describe behavior of such proteins. The average structure is always obtained mostly representing the most frequent conformation of the protein. The small-angle X-ray scattering (SAXS) can be used for study of such proteins and complexes. SAXS provides a low-resolution structure. The combination of SAXS with NMR or fluorescence techniques can be useful tool for gaining more detailed structural information. The circular dichroism (CD) is used for characterization of the secondary structure of proteins. The isothermal titration calorimetry (ITC) and the analytical ultracentrifugation (AUC - sedimentation

equilibrium) are used for an acquisition of thermodynamic properties. The AUC - sedimentation velocity and the dynamic light scattering (DLS) are methods providing information about hydrodynamic properties of such proteins. Binding interface can be mapped using H/D exchange coupled to mass spectrometry (HDX-MS). Information about protein fold and binding interface can be obtained using limited proteolysis in the presence and the absence of its binding partner. There are many other techniques that can be used to study such proteins and their complexes but methods mentioned above are the most frequently used ones. Most of these techniques were used to study the structure of Pdc and its complex with 14-3-3. Based on this data, detailed structural model of the complex was proposed and the mechanism of a Pdc function regulation through the 14-3-3 binding was suggested.

2 Aims of the study

The main aim of this thesis is to structurally characterize the protein phosphatase 1 (Pdc) and its complex with the 14-3-3 protein, and based on that to clarify the role of 14-3-3 in the regulation of Pdc function.

The specific aims were:

- To biophysically characterize the N-terminal and C-terminal domains (Pdc-ND and Pdc-CD) of Pdc and to determine their binding affinities with 14-3-3 $\zeta\Delta$ C protein.
- To map the conformational changes within Pdc molecule upon its phosphorylation at Ser54 and Ser73.
- To map the binding interface of the complex between phosphorylated Pdc (Pdc-PP) and 14-3-3 $\zeta\Delta$ C.
- To structurally characterize Pdc in its free (apo) state and in the complex with the 14-3-3 $\zeta\Delta$ C protein.
- To clarify the hypothesis that the 14-3-3 $\zeta\Delta$ C binding affects the kinetics of dephosphorylation of Pdc *in vitro*.

3 Methods

To achieve proposed aims, following biochemical and biophysical methods were used:

- Expression, purification and phosphorylation of proteins
- Time-resolved fluorescence intensity decay measurements
- Tryptophan fluorescence quenching experiments
- Dynamic light scattering (DLS)
- Small-angle X-ray scattering (SAXS)
- Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)
- Analytical ultracentrifugation (AUC)
- Circular dichroism (CD)
- H/D exchange coupled to mass spectrometry (HDX-MS)
- Limited proteolysis visualized on gel after SDS-PAGE
- Limited proteolysis coupled to mass spectrometry
- Limited dephosphorylation visualized on SDS-Phos-TagTM gel
- Limited dephosphorylation coupled to mass spectrometry

4 Results and discussion

4.1 Biophysical and structural characterization of phosducin (Pdc)

The crystal structure of the complex of Pdc with $G\beta\gamma$ shows that the molecule of Pdc consists of two domains: N-terminal (Pdc-ND, residues 1-107) and C-terminal (Pdc-CD, residues 114-246) domain [2, 4]. These studies indicate that Pdc-ND is flexible and in its apo-state it could show the character of an intrinsically disordered protein (IDP). To verify this hypothesis, biophysical and structural characterization of both domains has been performed using several biophysical methods.

Both the whole Pdc molecule and its isolated domains were characterized. For characterization of both domains dynamic light scattering (DLS) (Table 4.1), circular dichroism (CD) (Fig. 4.1), analytical ultracentrifugation (AUC) (Fig. 4.2, p. 27), time-resolved quenching of fluorescence of ANS and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) were used. Selected results are shown below.

Table 4.1 Hydrodynamic radii of proteins from DLS experiments

	PdcQ52K	Pdc-ND	Pdc-CD
No. of residues ^a	265	126	156
M_w ^b (g · mol ⁻¹)	30161.4	14643.2	17414.2
R_H (Å)	38.4 ± 0.5	35.4 ± 0.4	26.0 ± 0.1

^aThis includes the N-terminal His₆ tag without first methionin.

^bData were calculated from the sequence.

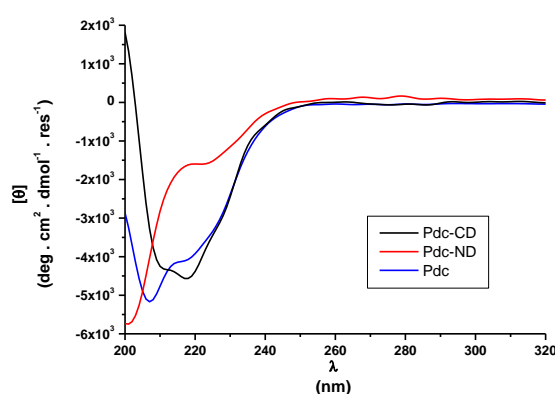
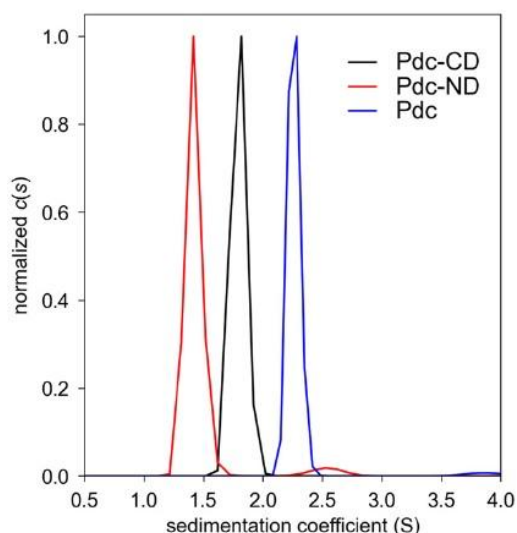


Fig. 4.1 The comparison of far-UV CD spectra of Pdc full-length, Pdc-ND and Pdc-CD. Graph shows the dependence of molar mean residue ellipticity $[\theta]$ to wavelength λ . Pdc-ND curve (red) is typical for protein without secondary structure components. Pdc-CD curve (black) shows behavior with components of secondary structure. Full-length Pdc curve (blue) is typical for partly folded protein.

Fig. 4.2 Normalized continuous distribution of sedimentation coefficients, $c(s)$, for Pdc full-length, Pdc-ND and Pdc-CD. Data were obtained using sedimentation velocity method. The concentrations of proteins were $\sim 40\mu\text{M}$. Pdc-ND (red) shows the smallest sedimentation coefficient, because of its disordered native structure in solution. Pdc-CD (black) shows higher sedimentation coefficient because of its more compact structure what leads to smaller friction. The highest sedimentation coefficient show full-length Pdc (blue) with the highest molecular mass.



These results confirm that Pdc-ND is IDP without any noticeable secondary and tertiary structure components. Pdc-CD is well-folded structured protein. The high value of the hydrodynamic radius R_H is likely caused by the presence of unstructured and flexible Pdc-ND as suggested by results of DLS (Table 4.1, p. 26) and AUC (Fig. 4.2).

The Pdc-CD, Pdc and the complex of phosphorylated Pdc (Pdc-PP) with 14-3-3 were characterized using NMR spectroscopy (Fig. 4.6, p. 31). The whole molecule of Pdc was also characterized using the small-angle X-ray scattering method (SAXS). To analyze the SAXS data, the ensemble optimization method (EOM) [5] was used because of the unstructured native behavior of Pdc. EOM provides an approximate model of unstructured protein, Pdc in this case. Scattering data (black line) from the SAXS measurements are shown in Fig. 4.3A, p. 27. Theoretical SAXS profile (red curve) was derived from an ensemble calculated using the EOM with the Pdc model based on flexible Pdc-ND and folded Pdc-CD. Red profile responds to the average of eighteen conformers (Fig. 4.3B) that fits the experimental scattering curve of Pdc ($c = 4.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Four EOM-generated models of Pdc that fit the experimental scattering curve with the lowest χ^2 value are shown in Fig. 4.3C. None of these conformers by itself could account for the observed Pdc scattering as it is shown from $P(r)$ curves calculated from EOM-generated models (Fig. 4.3D).

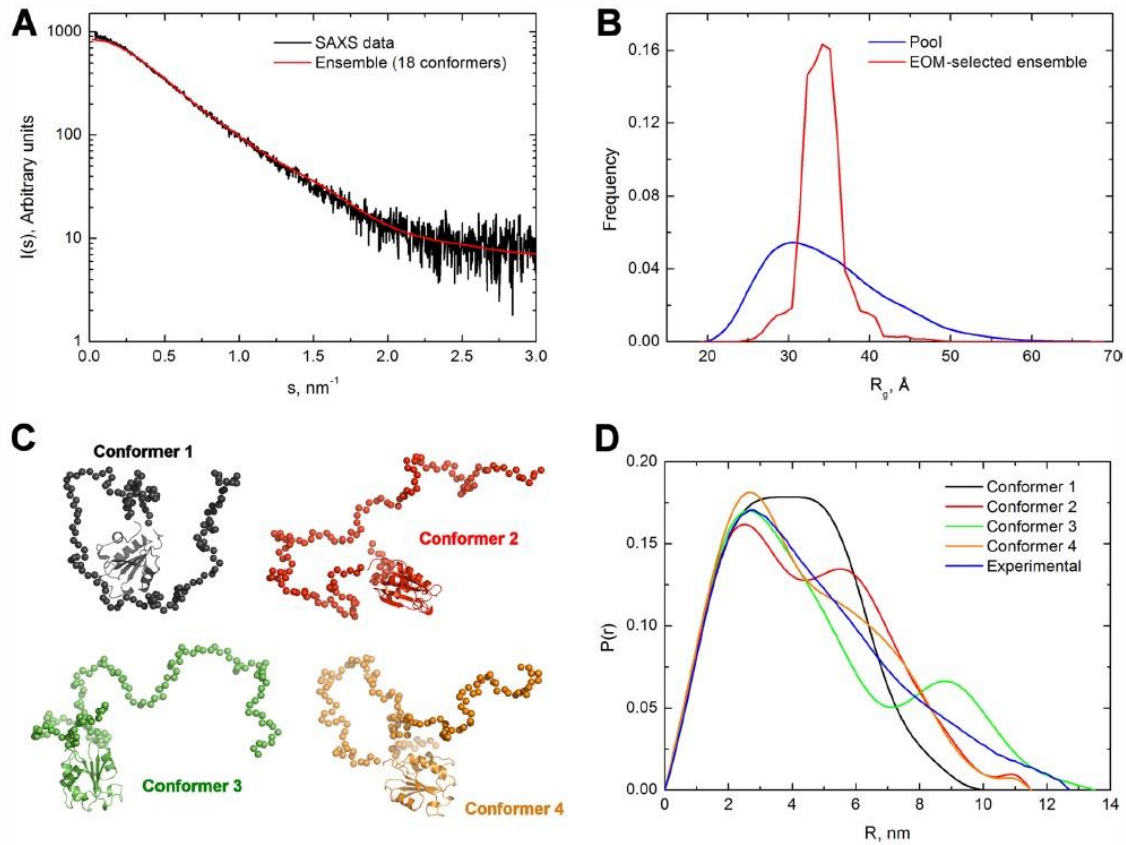


Fig. 4.3 EOM analysis of Pdc data. (A) Comparison of the experimental SAXS profile (shown in black) with the theoretical one (shown in red) derived from an ensemble calculated using the EOM with the Pdc model based on flexible Pdc-ND and folded Pdc-CD. The selected ensemble fits the experimental scattering 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 $P(r)$ calculated from EOM-generated models (shown in black, red, green, and orange) with the experimental $P(r)$ curve (shown in black).

4.2 Biophysical and structural characterization of Pdc-PP and 14-3-3/Pdc-PP

Recent studies suggested [6, 7] that in the eye retina Pdc is bound by 14-3-3 protein. The presence of two phosphorylated residues (pSer54, pSer73) located within the N-terminal part of the Pdc molecule (Pdc-ND) is necessary for the 14-3-3 binding as suggested by AUC – sedimentation velocity method. The same method was used for the determination of the stoichiometry of the 14-3-3/Pdc-PP complex. These results showed that the stoichiometry is 2:1 where one molecule of Pdc is bound by a dimer of 14-3-3. A range of different molar ratios between full-length Pdc-PP (or Pdc-ND-PP and Pdc-CD) and 14-3-3 $\zeta\Delta C$ was examined using sedimentation velocity AUC. Analysis of

isotherm of weight-averaged s values (s_w isotherm) as a function of Pdc-PP concentration revealed the best fit apparent equilibrium dissociation constant (K_d) of ca. 7 μM . Analysis of the s_w isotherm determined for complex with Pdc-ND-PP revealed that Pdc-ND-PP exhibits slightly higher binding affinity for 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ with the best fit K_d of ca. 3 μM . However, the s_w isotherm for Pdc-CD revealed no significant binding interaction with 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ suggesting that phosphorylation-dependent interaction between Pdc-ND-PP and 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ is responsible for the stability of the 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ /Pdc-PP complex.

Dynamic light scattering results show that hydrodynamic radii R_H of Pdc and 14-3-3 are comparable even though the molecular mass of 14-3-3 is two-times higher compared to Pdc (Table 4.2). After the complex formation, the R_H value did not increase too much compared to the proteins alone. This could mean that unstructured Pdc-ND is located within the central channel of the 14-3-3 dimer.

Table 4.2 Hydrodynamic radii of proteins from DLS experiments

	14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$	PdcQ52K	PdcQ52K-PP	14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ + PdcQ52K	14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ + PdcQ52K-PP
$R_{H,DLS}^a$ (Å)	36,6 ± 0,5	37,4 ± 0,3	38,2 ± 0,5	36,9 ± 0,1	44,2 ± 0,6
$R_{H,theor.}^b$ (Å)	25,4	20,6	20,6	-	29,3
M_w^c (g · mol ⁻¹)	56896,0 ^d	30161,4 ^e	30161,4 ^e	-	87021,5 ^f

^aValues are the mean ± SD of five measurements.

^bTheoretical R_H of a spherical rigid protein molecule without hydration estimated from the equation $R_H[\text{protein}] = 66 \cdot 10^{-12} \cdot M_w^{1/3}$ where M_w is molecular mass (g · mol⁻¹) [8].

^cData were calculated from the sequence including the N-terminal His₆ tag without first methionin.

^dMolecular mass of a 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ dimer which contains two N-terminal His₆ tags.

^eMolecular mass without first methionin in N-terminal His₆ tag.

^fMolecular mass without first methionin in N-terminal His₆ tag PdcQ52K and 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ dimer containing two N-terminal His₆ tags.

Further experiments studied: (a) the effect of Pdc phosphorylation on its structure and flexibility, and (b) the effect of the 14-3-3 binding on the structure and flexibility of Pdc-PP. The time-resolved tryptophan fluorescence intensity decay measurements and Cys-AEDANS fluorescence intensity decay measurements were used in these studies. Polarized time-resolved emission measurements were performed to examine the segmental dynamics of the fluorophores after the phosphorylation and the 14-3-3 ζ binding. Multiple single Trp- and single Cys-containing mutants of Pdc were prepared for these measurements. Pdc-WT (wild type) contains just one tryptophan residue (Trp29). To monitor conformational changes within other regions of Pdc, four additional single Trp mutants were prepared. Pdc-WT contains five Cys residues and two of them are

located within Pdc-ND and three in Pdc-CD. The summary of fluorescence measurements focused on the 14-3-3 binding is shown in Fig. 4.4. Fig. 4.4 shows which fluorophores exhibited increase in mean excited-state lifetime τ_{mean} upon the 14-3-3 binding (green strips) thus suggesting direct physical contact.

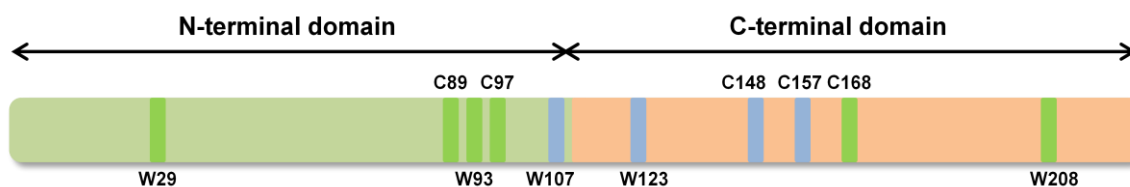


Fig. 4.4 Schematic representation of Pdc molecule with highlighted positions of fluorophores that evince higher τ_{mean} value (green strips) after 14-3-3 binding. The blue strips correspond to positions of fluorophores which τ_{mean} values stayed unchanged after 14-3-3 binding.

The Fig. 4.5 shows which fluorophores exhibited increase (green strips) or decrease (red strips) in flexibility upon the 14-3-3 binding. The change in flexibility is reflected by the change in amplitudes β_{short} or β_3 values. The higher β_{short} value (or lower β_3) corresponds to the higher presence of fast local movements in labelled region.

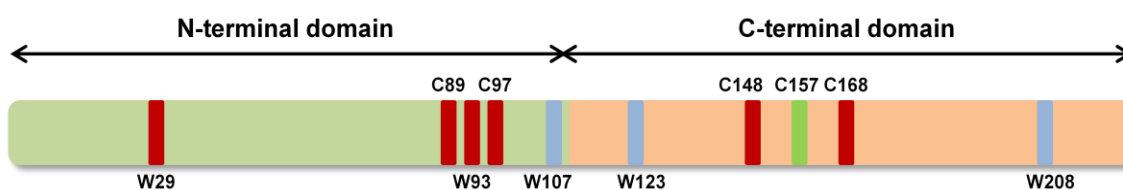


Fig. 4.5 Schematic representation of Pdc molecule with highlighted positions of fluorophores that evince higher (green strips) or lower (red strips) flexibility after 14-3-3 binding. The blue strips correspond to positions of fluorophores which flexibility stayed unchanged after 14-3-3 binding.

Pdc in its free (apo) state and the 14-3-3/Pdc-PP complex were further studied using NMR spectroscopy. Fig. 4.6, p. 31 shows 2D NMR ^1H - ^{15}N TROSY spectra of isotope labelled apo-Pdc-PP (black) and isotope labelled Pdc-PP bound in the complex (red). The disappearing of Ser54 and Ser73 signals occurred after the 14-3-3 binding indicating that these two serines are involved in the binding and are in direct physical contact with 14-3-3. The signals between 8 and 9 ppm correspond to unstructured Pdc-ND. This area also contains the very C-terminal part of Pdc-CD which is also unstructured [9].

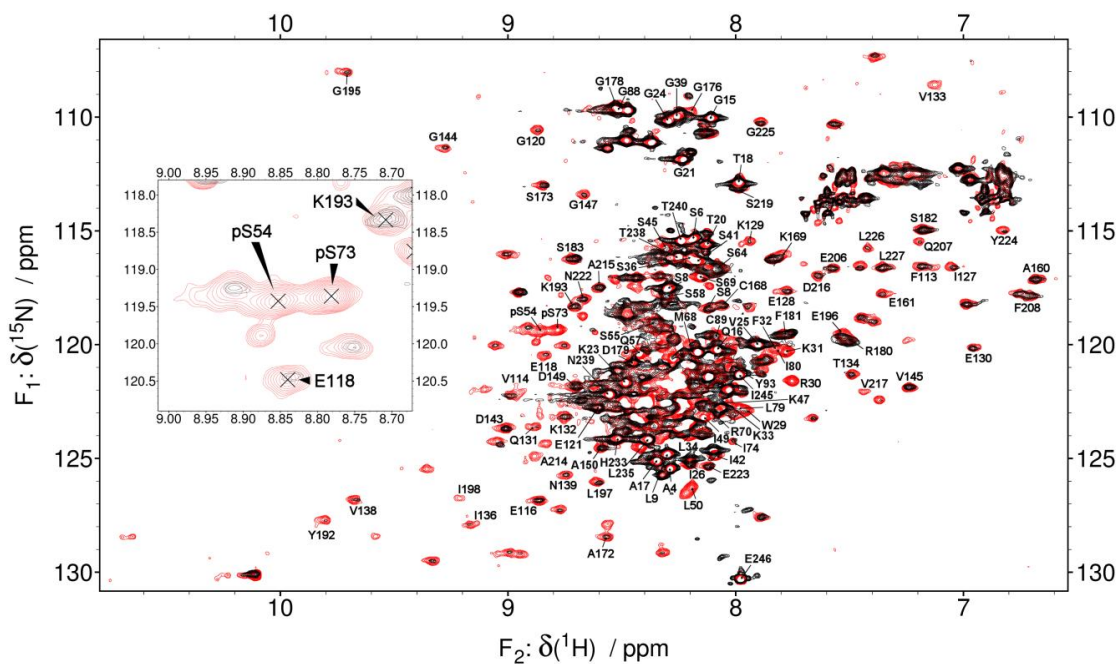


Fig. 4.6 ^1H - ^{15}N TROSY spectrum of Pdc-PP in the absence (black) and the presence of 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ (red). Overlapping signals in the centre part of the spectrum are not labelled for better clarity. The detail of the TROSY spectrum corresponding to the region of phosphorylated serines resonances is depicted in inset. The 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$:Pdc-PP molar ratio was 2:1.

To map the binding interface of the 14-3-3/Pdc-PP complex, the H/D exchange coupled to mass spectrometry (HDX-MS) measurements was performed. This method monitors the kinetics of deuteration of amide nitrogens within the protein backbone. The results showed that the 14-3-3/Pdc-PP complex exhibits transient interaction. Changes in kinetics were observed on 14-3-3 dimer surface which includes central channel and outer parts of the 14-3-3 dimer. Thus, these regions are involved in the interaction with Pdc-PP.

Low-resolution model of the complex was obtained using SAXS (Fig. 4.7, p. 32). The *ab initio* shape reconstruction of the complex is shown in Fig. 4.7A, p. 32. Upper part of a complex envelope corresponds to Pdc-CD. Pdc-ND is located into the central channel of the 14-3-3 dimer. Fig. 4.7C shows *ab initio* shape reconstruction of the 14-3-3 protein dimer with superimposed crystal structure of 14-3-3 ζ [11]. The all-atom modelling of the 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ /Pdc-PP complex was performed using the AllosMod-FoXS method which is based on sampling protein conformations to generate structures to compare to experimental SAXS profiles (Fig. 4.8, p. 33) [14, 15].

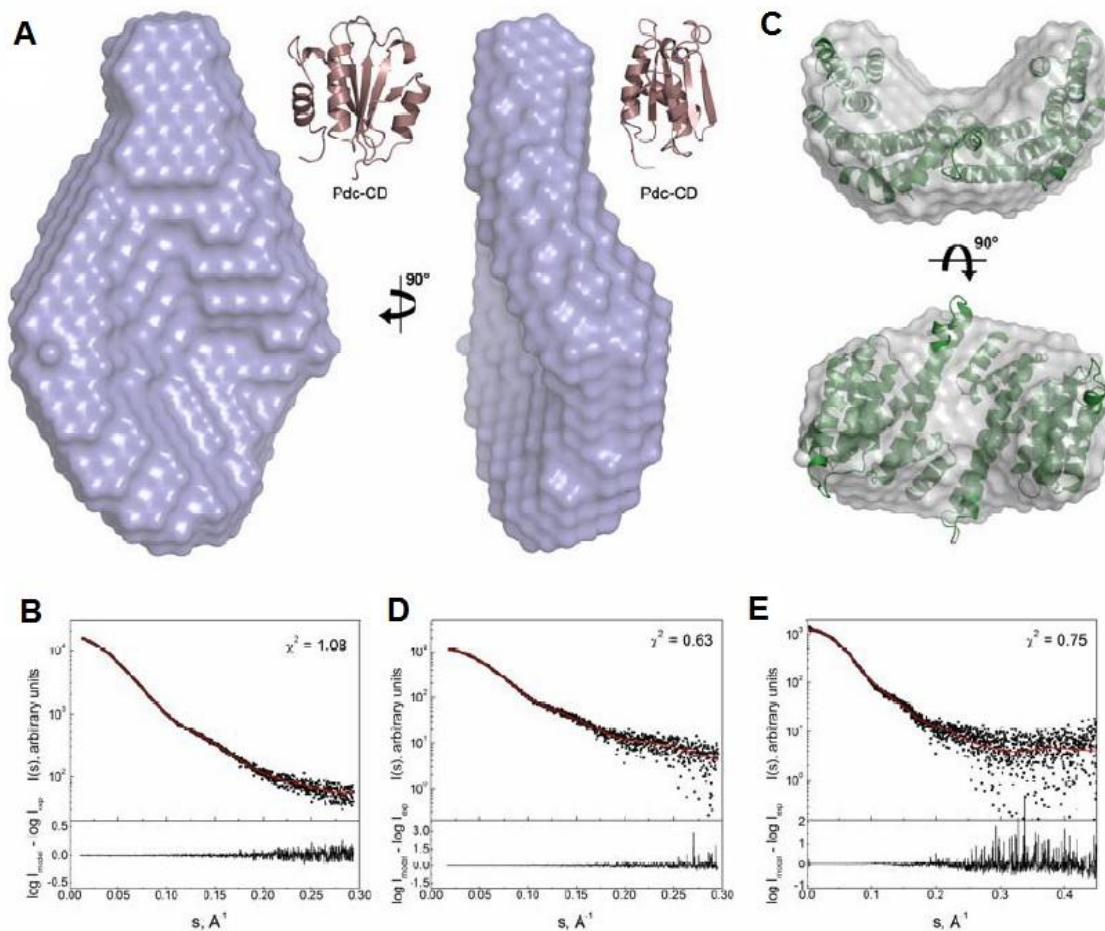


Fig. 4.7 *Ab initio* shape reconstructions. (A) *Ab initio* shape reconstruction of the 14-3-3 ζ AC/Pdc-PP complex (represented as a gray envelope) calculated from the SAXS data of the complex at $5.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. (B) Comparison of the experimental SAXS profile of the complex (at $5.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) with the fit for its DAMMIF [10] *ab initio* model (red line). (C) *Ab initio* shape reconstruction of 14-3-3 ζ AC calculated from the SAXS data (at $4.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) with superimposed crystal structure of 14-3-3 ζ . (D) Comparison of 28 the experimental SAXS profile of 14-3-3 ζ AC (at $4.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) with the fit for its DAMMIF *ab initio* model (red line). (E) Comparison of the calculated scattering curve of the crystal structure of 14-3-3 ζ [11] (red line) with the experimental scattering data. DAMMIF *ab initio* model of 14-3-3 ζ AC and its crystal structure were aligned using the program SUPCOMB [12]. Theoretical scattering curve of 14-3-3 ζ AC was calculated using CRY SOL [13].

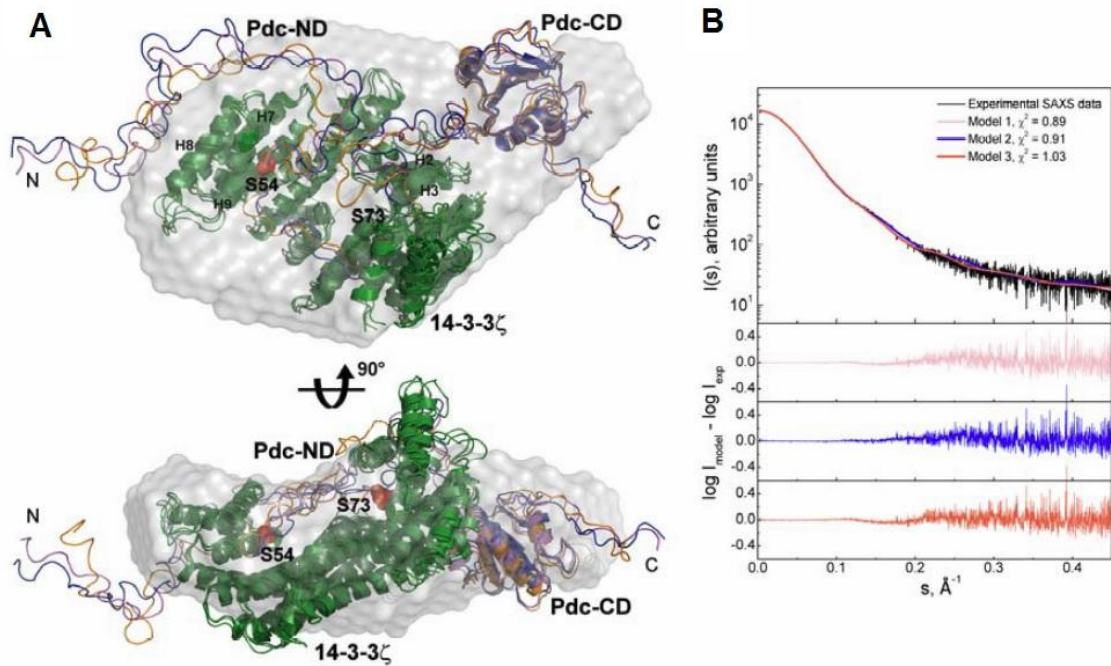


Fig.4.8 All-atom modelling of the 14-3-3 ζ /Pdc-PP complex. **(A)** Three best-scoring models of the 14-3-3 ζ /Pdc-PP complex calculated using the AllosMod-FoXS server [14, 15]. The 14-3-3 ζ is shown in green, Pdc is shown in magenta (model #1), blue (model #2) and orange (model #3). AllosMod models are superimposed with the DAMMIF *ab initio* model (represented as a gray envelope) calculated from the SAXS data of the complex at 5.6 mg · mL⁻¹. **(B)** Comparison of the calculated scattering curves of the three best-scoring AllosMod models of the complex (magenta, blue and orange lines) with the experimental scattering data of the complex at 5.6 mg · mL⁻¹ (black line). Theoretical scattering curves were calculated and fitted to experimental data using FoXS [16]. DAMMIF *ab initio* model of the complex and its AllosMod models were aligned using the program SUPCOMB [12].

Presented models show that Pdc-ND is positioned within the central channel of the 14-3-3 protein dimer suggesting that the majority of Pdc sequence involved in G $\beta\gamma$ binding is masked upon the interaction with 14-3-3.

It has also been speculated that the 14-3-3 binding slows down the dephosphorylation of phosphorylated Pdc [7]. Two phosphatases have been shown to dephosphorylate Pdc-PP *in vivo*: proteinphosphatase 1 (PP1) and proteinphosphatase 2A (PP2A) [17, 18]. This suggestion was proved *in vitro* using limited dephosphorylation coupled to mass spectrometry (Fig. 4.9, p. 34).

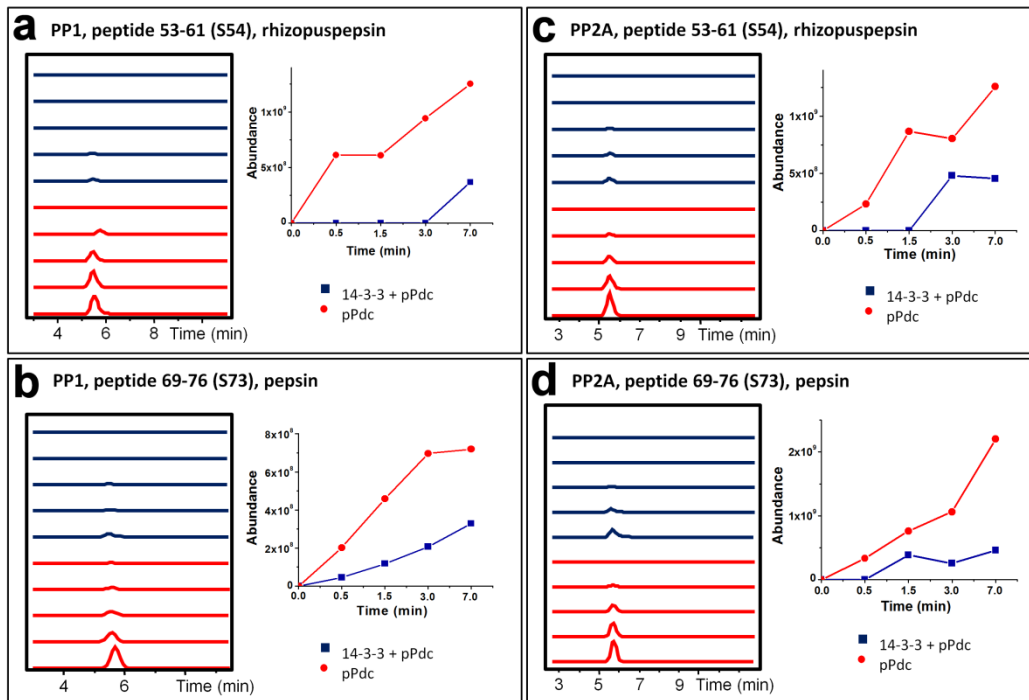


Fig.4.9 Dephosphorylation of Pdc-PP at pS54 and pS73 by PP1 and PP2A in the absence and the presence of 14-3-3 $\zeta\Delta C$. Panels show time-dependent changes of extracted ion chromatograms and calculated abundances of two selected peptides containing 14-3-3 binding motifs generated by the proteolytic cleavage of Pdc which was dephosphorylated in the absence and the presence of 14-3-3 $\zeta\Delta C$.

To conclude obtained results, the model of Pdc in its free state and in the complex with 14-3-3 was obtained. Structural model shows that 14-3-3 physically occludes the significant part of G $\beta\gamma$ -binding surface of Pdc thus explaining the ability of 14-3-3 to block interaction between Pdc and G $\beta\gamma$. In addition, we also showed that the 14-3-3 binding slows down the dephosphorylation of phosphorylated Pdc *in vitro* likely by blocking the access of PP1 and PP2A to phosphosites.

5 Conclusions

The main aim of this thesis was to study the structure of Pdc and its complex with the 14-3-3 protein. Several biophysical and biochemical techniques were used as principal tools. In addition, the kinetics of dephosphorylation of Pdc after the 14-3-3 binding has also been investigated.

Most important results of this thesis are:

- Pdc-ND is intrinsically disordered protein (IDP) without any secondary and tertiary structure. Pdc-CD is structured well-folded protein.
- Binding affinity of phosphorylated Pdc-ND to 14-3-3 $\zeta\Delta C$ is higher ($K_d \sim 3 \mu\text{M}$) compared to full-length Pdc-PP ($K_d \sim 7 \mu\text{M}$). Binding of Pdc-CD to 14-3-3 $\zeta\Delta C$ has not been observed ($K_d > 500 \mu\text{M}$). This means that phosphorylated Pdc-ND plays a key role in the complex formation.
- Changes in flexibility especially in Pdc-ND have been observed after the phosphorylation of Pdc. Pdc-CD interacts with phosphorylated Pdc-ND in the absence of binding partner.
- Both phosphorylation sites of Pdc (Ser54, Ser73) are crucial for the 14-3-3 binding. The 14-3-3 binding masks the majority of the $G\beta$ -binding surface of Pdc-ND by sequestering this part into the central channel of the 14-3-3 dimer. Pdc-PP bound in the complex stays highly flexible as has been suggested by NMR and HDX-MS data. These results indicate that the 14-3-3/Pdc-PP complex possesses “fuzzy” character.
- The 14-3-3 binding slows down the dephosphorylation of Pdc-PP by PP1 and PP2A *in vitro*.

Použitá literatura / References:

- [1] Kacířová, M.: *Studium struktury komplexu 14-3-3:Pdc.*, Diplomová práce, PřF UK, Praha (2011).
- [2] Gaudet, R., Bohm, A., Sigler, P. B.: *Cell*, 87, 577-588 (1996).
- [3] Tompa, P., Fuxreiter, M.: *Trends in Biochemical Science*, 33, 2 - 8 (2008).
- [4] Gaudet, R., Savage, J. R., McLaughlin, J. N., Willardson, B. M., Sigler, P. B.: *Molecular Cell*, 3, 649-660 (1999).
- [5] Bernado, P., Svergun, D. I.: *Molecular BioSystems*, 8, 151 – 167 (2012).
- [6] Nakano, K., Chen, J., Tarr, G. E., Yoshida, T., Flynn, J. M., Bitensky, M. W.: *Neurobiology*, 98, 4693 - 4698 (2001).
- [7] 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.: *Journal of Biological Chemistry*, 276, 23805 - 23815 (2001).
- [8] Rothe, G. M.: *Electrophoresis*, 9, 307 – 316 (1988).
- [9] Kacirova, M., Kosek, D., Kadek, A., Man, P., Vecer, J., Herman, P., Obsilova, V., Obsil, T.: *The Journal of Biological Chemistry*, 290, 16246 – 16260 (2015).
- [10] Franke, D., Svergun, D. I.: *Journal of Applied Crystallography*, 42, 342 - 346 (2009).
- [11] Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L. C., Smerdon, S. J., Gamblin, S. J., Yaffe, M. B.: *Molecular Cell*, 4, 153 - 166 (1999).
- [12] Kozin, M. B., Svergun, D. I.: *Journal of Applied Crystallography*, 34, 33 - 41 (2001).
- [13] Svergun, D., Barberato, C., Koch, M. H. J.: *Journal of Applied Crystallography*, 28, 768 - 773 (1995).
- [14] Schneidman-Duhovny, D., Hammel, M., Sali, A.: *Nucleic Acids Research*, 38, W540 - 544 (2010).
- [15] Weinkam, P., Pons, J., Sali, A.: *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 109, 4875 - 4880 (2012).
- [16] Schneidman-Duhovny, D., Hammel, M., Tainer, J. A., Sali, A.: *Biophysical Journal*, 105, 962 - 974 (2013).
- [17] Yoshida, T., Willardson, B. M., Wilkins, J. F., Jensen, G. J., Thornton, B. J., Bitensky, M. W.: *Journal of Biological Chemistry*, 269, 24050 - 24057 (1994).
- [18] Brown, B. M., Carlson, B. R., Zhu, X., Lolley, R. N., Craft, C. M.: *Biochemistry*, 41, 13526 – 13538 (2002).

Curriculum vitae

Personal Data

Miroslava Kacířová, borned 1987, unmarried, residence Třinec, Czech Republic

Education

2011 – present Charles University in Prague, Faculty of Science, Physical Chemistry, Ph.D. study
2009 – 2011 Charles University in Prague, Faculty of Science, Biophysical Chemistry, M.Sc.
2006 – 2009 Charles University in Prague, Faculty of Science, Biochemistry, Bc.

Job postitions

2009 – 2016 Institute of Physiology, The Czech Academy of Sciences, Department of Protein Structures
2012 – present Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Physical and Macromolecular Chemistry

Research and Software Expertise

- cloning, mutagenesis, expression and purification of proteins (sonication, chromatography, SDS-PAGE), protein isotopic labelling for NMR studies, protein phosphorylation by PKA, fluorescence techniques, DLS, CD, AUC, NMR, Mass Spectrometry (MS), H/D exchange coupled to MS, ITC, SAXS, MST, limited proteolysis, limited dephosphorylation, Phos-TagTM gels preparation, native gel electrophoresis
- MS Office; Zoner Callisto; ChemSketch; Origin; PyMOL; DataAnalysis 4.2; GPMW 8.0; Sparky; BioEdit; NanoAnalyze 3.6.0

Teaching

Chemistry and biophysical chemistry seminars at Charles University in Prague, Faculty of Science

Workshops attendance

- Seminar: Moderní problémy NMR spektroskopie, Pec pod Sněžkou, Nov 14–19, 2010.
- Circular and Linear Dichroism Workshop, Warwick, England, Sep 9-11, 2013.
- Seminar: Moderní problémy NMR spektroskopie, Pec pod Sněžkou, Nov 3–8, 2013.
- The 1st FEBS-Instruct crystallization course in the middle EU: Advanced methods in macromolecular crystallization VI, Nové Hradky, Jun 20-27, 2014. RIGAKU grant.

Contributions with talk

- Kacířová, M., Rezaczková, L., Sulc, M., Herman, P., Vecer, J., Stepanek, M., Obsilova, V., Obsil, T.: *Structural basis of the 14-3-3 protein-dependent regulation of fosducin*, 10th Discussions in Structural Molecular Biology, Nové Hradky, March 22-24, 2012. Abstract in *Materials Structure*, 19 (1), 21 (2012).
- Kacířová, M., Řežábková, L., Kádek, A., Man, P., Nováček, J., Večeř, J., Štěpánek, M., Obšilová, V., Obšil, T.: *Biofyzikální charakterizace fosducinu a jeho komplexu s vazebným partnerem – proteinem 14-3-3*, XIV Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků, Milovy, May 13-16, 2014. Abstract in *Chemické listy*, 108, 519-560 (2014).
- Kacířová, M., Kádek, A., Man, P., Nováček, J., Obšilová, V., Obšil, T.: *Strukturální studie proteinového komplexu 14-3-3/Pdc*, XV Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků, Milovy, May 12-15, 2015. Abstract in *Czech Chem. Soc. Symp. Ser.*, 13, 16 (2015).

Contributions with poster

- L. Rezaczková, M. Kacířová, P. Herman, J. Vecer, M. Sulc, T. Obsil: *Biophysical characterization of fosducin/14-3-3 protein complex*, 8th Discussions in Structural Molecular Biology, Nové Hradky, March 18-20, 2010. Abstract in *Materials Structure*, 17 (1a), 49 (2010).

- M. Kacirova, L. Rezaczkova, P. Herman, J. Vecer, M. Sulc, T. Obsil: *Structural studies of 14-3-3/phosducin komplex*, 9th Discussions in Structural Molecular Biology, Nové Hrady, March 24-26, 2011. Abstract in *Materials Structure*, 18 (1), 47 (2011).
- M. Kacirova, P. Man, A. Kadek, T. Obsil: *Mapping of the interaction surface of phosducin using HDX-MS*, 11th Discussions in Structural Molecular Biology, Nové Hrady, March 14-16, 2013. Abstract in *Materials Structure*, 20 (1), 29 (2013).
- M. Kacirova, P. Man, A. Kadek, T. Obsil: *Structural studies on Pdc/14-3-3 protein komplex*, 12th Discussions in Structural Molecular Biology, Nové Hrady, March 13-15, 2014. Abstract in *Materials Structure*, 21 (1), 36 (2014).
- M.Kacirova, J. Novacek, A. Kadek, P. Man, V. Obsilova, T. Obsil: *Structural characterization of phosphoprotein phosducin and its interaction with 14-3-3*, 13th Discussions in Structural Molecular Biology, Nové Hrady, March 19-21, 2015. Abstract in *Materials Structure*, 22 (1), 40 (2015).
- Kacirova, M., Rezaczkova, L., Herman, P., Vecer, J., Sulc, M., Obsil, T.: *Biophysical characterization of interactions between the 14-3-3 protein and phosphorylated phosducin*, 36th FEBS Congress of the Biochemistry for Tomorrows Medicine, Torino, Italy, Jun 25-30, 2011. Abstract in *FEBS Journal*, 278, 111-112 (2011).
- M. Kacirova, L. Rezaczkova, P. Herman, J. Vecer, M. Sulc, V. Obsilova, T. Obsil: *The 14-3-3 protein binding affects the conformation of both the N- and C-terminal domains of phosducin*, 22nd IUBMB & 37th FEBS Congress, From Single Molecules to Systems Biology, Sevilla, Spain, Sep 4-9, 2012. Abstract in *FEBS Journal*, 279, s1, 450 (2012).
- M. Kacirova, J. Novacek, L. Zidek, V. Obsilova, T. Obsil: *Investigation into Pdc behavior upon 14-3-3 binding using NMR, SAXS and Trp fluorescence quenching techniques*, 38th FEBS-EMBO Congress, Paris, France, Aug 30 - Sep 4, 2014. Abstract in *FEBS Journal*, 281, 287 (2014).
- M. Kacirova, L. Rezaczkova, P. Herman, J. Vecer, M. Sulc, M. Stepanek, V. Obsilova, T. Obsil: *Regulatory mechanism of phosducin function*, 4th EuCheMS Chemistry Congress, Prague, Aug 26-30, 2012.
- M. Kacirova: *The Mechanism of the regulation of phosducin function*, International Circular Dichroism User Group Meeting, Warwick, England, Sep 9, 2013.
- Kacirova, M., Novacek, J., Kadek, A., Man, P., Obsilova, V., Obsil, T.: *Biophysical characterization of phosducin and its komplex with 14-3-3 protein*, The 29th Annual Symposium of The Protein Society Barcelona, Španělsko, Jul 22–25, 2015. Abstract in Abstract Book http://www.barcelocongresos.com.es/protein2015/images/book_abstracts.pdf (August 2016), p. 214.

Publications

- Rezaczkova, L., Kacirova, M., Sulc, M., Herman, P., Vecer, J., Stepanek, M., Obsilova, V., Obsil, T.: *Structural modulation of phosducin by phosphorylation and 14-3-3 protein binding*. ***Biophys. J.***, 103, 1960 – 1989 (2012).
- V. Obsilova, M. Kopecka, D. Kosek, M. Kacirova, S. Kylarova, L. Rezaczkova, T. Obsil: *Mechanisms of the 14-3-3 protein function: regulation of protein function through conformational modulation*. ***Physiol. Res.***, 63, S155 – S164 (2014).
- 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.***, 290, 16246 – 16260 (2015).

Manuscript

- Kacirova, M., Novacek, J., Man, P., Obsilova, V., Obsil, T.: *Structural Basis for Regulation of Phosducin Function by 14-3-3 Protein*

Grants contribution

- GAČR, project P305/11/0708, co-researcher
- GAUK, project 28510, 2010 – 2013, co-researcher
- GAUK, project 793913, 2013 – 2015, main researcher

Language Skills

- Czech (native speaker), English (B2), German (A1), Slovak (conversational), Polish (conversational)