

UNIVERZITA KARLOVA

2. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



Vliv proteinu 14-3-3 na intradoménové interakce ubikvitin ligasy Nedd4-2

The effect of 14-3-3 protein on intradomain interaction of ubiquitin ligase
Nedd4-2

Mgr. Pavel Pohl

Praha, 2022

Disertační práce byla vypracována v rámci *prezenčního* studia doktorského studijního programu *Biochemie a patobiochemie* na 2. lékařské fakultě Univerzity Karlovy.

Školitel: *RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.*

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby oborové rady *Biochemie a patobiochemie* dne v od hod.

Předsedou komise pro obhajobu disertační práce byl jmenován:

Předseda oborové rady a garant doktorského studijního programu:

prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.

Děkan fakulty:

prof. MUDr. Marek Babjuk, CSc.

Tato práce vznikla za podpory grantů:

Grantové agentury České republiky, projekt číslo 20-00058S

Grantové agentury Univerzity Karlovy, projekt číslo 740119

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

Obsah

1. Úvod do problematiky	6
2. Cíle disertační práce.....	7
3. Metodika	8
3.1. Exprese a purifikace rekombinantních proteinů.....	8
3.2. Autoubikvitinační assay – ověření enzymatické aktivity	9
3.3. Měření polarizace fluorescence	10
3.4. Analytická ultracentrifugace – metoda sedimentačních rychlostí.....	10
3.5. Proteinová krystalografie.....	11
3.6. Chemické zesíťení spojené s hmotnostní spektrometrií.....	11
3.7. Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS) a strukturní modelování.....	12
4. Výsledky	12
4.1. Exprese a purifikace rekombinantních proteinů.....	12
4.2. Autoubikvitinační assay – ověření enzymatické aktivity	13
4.3. Polarizace fluorescence	14
4.4. Ověření interakce proteinu Nedd4-2 s proteiny 14-3-3 <i>in vitro</i>	15
4.5. Chemické zesíťení – mapování strukturních změn	17
4.6. Proteinová krystalizace.....	18
4.7. SAXS a modelování komplexu	20
5. Diskuse.....	21
6. Závěr	25
7. Souhrn	26
8. Použitá literatura	28

Abstrakt

Lidská ubikvitin ligasa Nedd4-2 (NEDD4L) ubikvitinuje široké spektrum membránových proteinů a receptorů a hraje tak klíčovou roli v udržování homeostázy organismu. Tento enzym je regulován fosforylací a následnou interakcí s proteiny 14-3-3, čímž je primárně ovlivněna schopnost proteinu Nedd4-2 interagovat s různými substráty. Jen velmi málo je však známo o molekulární podstatě této protein-proteinové interakce. V této práci jsme se zaměřili na biofyzikální charakterizaci úlohy jednotlivých fosforylačních míst a mapování strukturních změn Nedd4-2 způsobených vazbou proteinů 14-3-3. Naše experimenty za užití metod analytické ultracentrifugace odhalily, že k stabilní vazbě proteinu Nedd4-2 na proteiny 14-3-3 je zapotřebí primárně dvou fosforylačních míst Ser³⁴² a Ser⁴⁴⁸. Krystalová struktura komplexu 14-3-3 $\eta\Delta$ C:Nedd4-2³³⁵⁻⁴⁵⁵T367A poté odhalila simultánní vazbu obou fosforylovaných reziduí do vazebného žlábků proteinu 14-3-3. Modelování na základě dat z maloúhlového rozptylu rentgenového záření a chemického zesílení spojeného s hmotnostní spektrometrií nastínilo rozsáhlé strukturní změny v oblasti jednotlivých domén proteinu Nedd4-2. Vazba proteinu 14-3-3 η blokuje doménu WW3 proteinu Nedd4-2 v centrálním kanálu proteinu 14-3-3 a zároveň mění vzájemné pozice domén WW2 a WW4. WW domény Nedd4-2 jsou zodpovědné za následné rozpoznávání substrátů a změny v přístupnosti jednotlivých WW domén tak mohou objasnit, jak protein 14-3-3 moduluje ubikvitinaci některých substrátů ubikvitin ligasy Nedd4-2. Získané poznatky tak přinášejí první strukturní náhled do molekulární podstaty mechanismu regulace proteinu Nedd4-2 prostřednictvím proteinů 14-3-3.

Abstract

The human ubiquitin ligase Nedd4-2 (NEDD4L) ubiquitinates a wide range of membrane proteins and receptors, playing a key role in maintaining homeostasis. This enzyme is regulated by phosphorylation and subsequent interaction with 14-3-3 proteins, which primarily affects its ability to interact with various substrates. However, very little is known about the molecular basis of this protein-protein interaction. In this work, we focused on biophysical characterization of the role of individual phosphorylation sites and also on mapping the structural changes in the Nedd4-2 protein induced by 14-3-3 protein binding. Our experiments using analytical ultracentrifugation methods revealed that two phosphorylation sites Ser³⁴² and Ser⁴⁴⁸ are primarily required for stable binding of Nedd4-2 to 14-3-3 proteins. The crystal structure of the 14-3-3 η Δ C:Nedd4-2³³⁵⁻⁴⁵⁵T367A complex than revealed the simultaneous binding of both phosphorylated residues to the binding groove of 14-3-3 protein. Subsequent modeling based on small-angle X-ray scattering and chemical cross-linking data combined with mass spectrometry indicated extensive structural changes in the individual domains of the Nedd4-2 protein. Binding of 14-3-3 η protein blocks the WW3 domain of Nedd4-2 in the central channel of 14-3-3 protein, while altering the relative positions of the WW2 and WW4 domains. The WW domains of Nedd4-2 are responsible for downstream substrate recognition, and changes in the accessibility of individual WW domains may thus elucidate how 14-3-3 protein modulates the ubiquitination of some Nedd4-2 substrates. The findings provide the first structural insight into the molecular basis of the mechanism of Nedd4-2 protein regulation by 14-3-3 proteins.

1. Úvod do problematiky

Tato disertační práce je součástí výzkumného projektu laboratoře RNDr. Veroniky Obšilové, Ph.D. na Fyziologickém ústavu Akademie věd ČR, v.v.i., na detašovaném pracovišti BIOCEV. Výše zmíněná laboratoř má rozsáhlé zkušenosti se studiem interakčních partnerů proteinů 14-3-3, které se podílejí na regulaci několika stovek různých proteinů.

Jedním ze známých interakčních partnerů proteinů 14-3-3 je také lidská ubikvitin ligasa Nedd4-2, která svou činností reguluje desítky substrátů zcela zásadních pro udržení homeostázy organismu. Experimenty provedené na živých systémech prokázaly, že vznik komplexu mezi proteiny Nedd4-2 a 14-3-3 vede ke změně substrátové specifity proteinu Nedd4-2. Absence strukturních dat pro samotnou ubikvitin ligasu Nedd4-2 a její komplex s proteiny 14-3-3 však neumožňuje přesně popsat mechanistické principy této interakce.

V publikacích zveřejněných v rámci této práce jsme si kladli za cíl strukturně a biofyzikálně charakterizovat protein Nedd4-2 a jeho komplex s proteiny 14-3-3, a tím poskytnout první strukturní náhled do mechanismů regulace této významné ubikvitin ligasy. Předložená disertační práce poskytuje obecné informace o vlastnostech a významu obou studovaných interakčních partnerů a popisuje experimentální postupy, jež vedly k publikovaným výsledkům. Naše publikovaná data pak poskytují odpovědi na některé z námi kladených otázek a stávají se tak odrazovým můstkem pro budoucí experimenty v rámci plánovaných navazujících projektů.

2. Cíle disertační práce

Tato disertační práce je zaměřena na objasnění molekulární podstaty vlivu proteinu 14-3-3 na intradomenové interakce lidské ubikvitin ligasy Nedd4-2. Cílem této práce je rozklíčování příspěvků jednotlivých fosforylačních míst na proteinu Nedd4-2 k celkové síle této interakce a mapování strukturních změn na proteinu Nedd4-2 indukovaných vazbou proteinu 14-3-3. Hlavními experimentálními přístupy jsou exprese a purifikace proteinů, cílená bodová mutagenese, měření polarizace fluorescence, analytická ultracentrifugace (AUC), proteinová krystalografie, chemické zesítení spojené s hmotnostní spektrometrií, malouhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS) a modelování *in silico* na základě kombinovaných dat.

Konkrétními cíli jsou:

- 1) Příprava aktivního konstruktů proteinu Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ ve stabilní a rozpustné formě, optimalizace jeho exprese a purifikace a fosforylace.
- 2) Ověření katalytické aktivity konstruktů Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ pomocí auto-ubikvitinační eseje.
- 3) Určení stechiometrie vazby Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ s proteinem 14-3-3.
- 4) Příprava, exprese, purifikace a fosforylace konstruktů proteinu Nedd4-2³³⁵⁻⁴⁵⁵ a jeho 8 mutantních forem obsahující žádné, jedno, dvě či tři fosforylační místa.
- 5) Ověření vazby proteinu 14-3-3 na jednotlivé mutantní varianty Nedd4-2³³⁵⁻⁴⁵⁵ pomocí AUC a nativní TBE-PAGE a porovnání příspěvků jednotlivých fosforylačních míst.
- 6) Určení isoformové specificity 7 lidských isoform proteinu 14-3-3 k jednotlivým fosforylovaným motivům.
- 7) Krystalizace konstruktů Nedd4-2³³⁵⁻⁴⁵⁵ v komplexu s proteinem 14-3-3 η .
- 8) Mapování strukturních změn proteinu Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ vyvolaných vazbou proteinu 14-3-3 η pomocí chemického zesítení.
- 9) Strukturní charakterizace proteinu Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ a jeho komplexu s proteinem 14-3-3 η za použití metody SAXS.
- 10) Počítačové modelování komplexu za použití dat ze SAXS a chemického zesítení.

3. Metodika

3.1. Exprese a purifikace rekombinantních proteinů

Expresa a purifikace proteinů je zásadním krokem pro všechny *in vitro* strukturně-biologické a biofyzikální studie proteinových molekul a jejich komplexů. Cílem je získat dostatečné množství stabilních, ale zároveň i co nejvíce biologicky relevantních biomolekul o vysoké čistotě. Všechny proteiny a proteinové konstrukty studované v této práci byly připraveny rekombinantně, za užití komerčně dostupného prokaryotického expresního systému *E. coli* BL21(DE3). Geny pro expresi lidských proteinů byly do bakteriálních buněk vloženy jako součást různých expresních plasmidů (pET-15b, 2, pST39, pRSFDuet-1 či pET-28a).

Všechny proteiny purifikované v rámci předložené disertační práce byly purifikovány s histidinovou purifikační značkou (6x His-Tag), která zaujímala různou pozici v rámci různých exprimovaných konstruktů. Prvním krokem purifikace byla vždy niklová chelatační chromatografie následovaná buďto přečištěním na aniontově výměnné koloně, nebo pomocí gelové permeační chromatografie, nebo kombinací obou přístupů. V případě, že byla použita varianta proteinu s odštěpitelnou purifikační značkou, byla tato značka po niklové chelatační chromatografii odštěpena TEV proteázou.

Tab. 3.1: Seznam purifikovaných proteinů

Název	Vektor	Počet AA	M _w (kDa)	pI	Expresce	Purifikační kroky	Účel
14-3-3η	pET-15b	248	28,4	4,81	LB, 30 °C, O/N	Ni ⁺ , a. v., SEC	FP, SAXS, AUC, XL- MS, fluorescence
14-3-3ηΔC	pET-15b	236	27,2	5,07	LB, 30 °C, O/N	Ni ⁺ , a. v., SEC	Xtal
Nedd4-2 ³³⁵⁻⁴⁵⁵	pHGT2	125	13,3	9,51	LB, 18 °C, O/N	Ni ⁺ , SEC	AUC, Xtal
Nedd4-2 ¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵	pST39	799	91,7	5,85	LB, 18 °C, O/N	Ni ⁺ , SEC	AUC, SAXS, XL-MS
Nedd4-2 ¹⁹⁰⁻⁵⁸¹	pST39	402	45	6,56	LB, 18 °C, O/N	Ni ⁺ , SEC	Fluorescence
Uba1 (E1)	pET-28a	1 060	118	5,45	LB, 15 °C, O/N	Ni ⁺ , SEC	Ub. esej
Ube2d2 (E2)	pET-15b	149	16,9	7,86	LB, 15 °C, O/N	Ni ⁺ , SEC	Ub. esej
Ub	pET-15b	78	11	6,70	LB, 25 °C, O/N	Ni ⁺ , SEC	Ub. esej

Zkratky: LB - Luria–Bertani médium; Ni⁺ - niklová chelatační chromatografie, a. v. – aniontová výměna, SEC - gelová permeační chromatografie, AUC – analytická ultracentrifugace, FP – fluorescenčně polarizační esej, XL-MS – chemické zesílení kombinované s hmotnostní spektrometrií, Xtal – proteinová krystalografie, SAXS – maloúhlový rozptyl rentgenového záření, Ub. esej – funkční autoubikvitinační esej.

3.2. Autoubikvitinační assay – ověření enzymatické aktivity

Konstrukt Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ obsahoval katalytickou HECT doménu, proto byl vhodný k ověření katalytické aktivity rekombinantně připraveného fúzního proteinu a zároveň nám umožnil zjistit případný efekt proteinu 14-3-3 na jeho aktivitu.

Při autoubikvitinační eseji se využívá schopnosti HECT E3 ligas regulovat svou vlastní činnost autoubikvitinací, případně také schopnosti tvořit *in vitro* volné polyUb řetězky. Ke sledování aktivity a případných změn vyvolaných vazbou proteinu 14-3-3 bylo využito metod SDS-PAGE a Western Blot. K vizualizaci přenesených polyUb řetězců byla použita králičí polyklonální protilátka anti-Ub (Enzo Life Sciences, Inc., USA) a protilátka proti králičímu IgG, konjugovaná s HRP (Cell Signaling Technology, Inc., USA). Chemiluminiscence byla

indukována ECL a detekována pomocí Fusion Solo S (Vilber, Francie). Detekované pruhy polyUb řetízků byly kvantifikovány pomocí softwaru Image Lab (Bio-Rad, USA).

3.3. Měření polarizace fluorescence

Měření polarizace fluorescence (c) je snadnou a rychlou metodou pro ověření interakce mezi proteiny a fluorescenčně značenou malou molekulou. Malá molekula nesoucí fluorescenční značku (fluorofor) je excitována lineárně polarizovaným světlem o vhodné vlnové délce. Vzhledem k tomu, že molekuly v roztoku rotují, je zpětně emitované záření depolarizované.

Tohoto principu bylo využito pro získání disociačních konstant fluorescenčně značených peptidů s různými isoformami proteinů 14-3-3. Titrační experiment byl proveden za konstantní koncentrace fosforylovaných peptidů (50 nM), značených na N-konci fluoresceinem (FITC), o délce 10 aminokyselin (Pepscan Presto BV), reprezentujících jednotlivé 14-3-3 vazebné motivy proteinu Nedd4-2. Proměnná byla koncentrace proteinů 14-3-3, přičemž počáteční koncentrace 80 μ M byla postupně ředěna dvojkovou řadou. Experiment byl proveden na přístroji CLARIOstar microplate reader (BMG Labtech, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) za použití 384 jamkové černé destičky s plochým dnem (Corning, New York, USA). Fluorofor byl excitován při vlnové délce 482 nm a emise byla měřena při 530 nm. Hodnoty K_D pak byly vypočítány z průměru tří nezávislých měření za použití vazebného modelu One-site bind – specific implementovaného do programu GraphPad Prism verze 8.0.1 (GraphPad Software, La Jolla California USA).

3.4. Analytická ultracentrifugace – metoda sedimentačních rychlostí

Analytická ultracentrifugace (AUC) je všestrannou a vysoce účinnou metodou pro kvantitativní analýzu makromolekul v roztoku. Stanovení vlastností měřených makromolekul probíhá na základě sedimentačního koeficientu, molekulové váhy a hydrodynamických vlastností částic (Cole et al., 2008). Všechny experimenty v předložené disertační práci byly měřeny metodou SV-AUC, tedy metodou sedimentačních rychlostí a to pro získání zdánlivých disociačních konstant (K_D) komplexů mezi konstrukty či mutanty proteinu Nedd4-2 a jeho interakčním partnerem proteinem 14-3-3.

Rychlost sedimentace byla měřena na přístroji ProteomeLab XL-I (Beckman Coulter, USA) při 40 000 či 46 000 ot./min (An-50 Ti rotor, Beckman Coulter). Byl použit optický systém měřícího absorpci při vlnové délce 280 nm. Samotný experiment pak spočíval v postupné titraci použitých konstruktů proteiny 14-3-3 či naopak. Různé molární poměry

proteinů pak vedly k různému zastoupení jednotlivých sedimentačních koeficientů, které korelovaly se zastoupením jednotlivých volných složek a složek v komplexu.

3.5. Proteinová krystalografie

Proteinová krystalografie je hojně používanou metodou umožňující získat modely proteinových struktur a to někdy až s atomárním rozlišením. Proteiny jsou v této metodě vystaveny prostředí, které vede k tvorbě tzv. krystalových kontaktů mezi molekulami proteinu a jejich následné organizaci do pravidelných krystalových mřížek. Takto vzniklé krystaly pak mohou být podrobeny difrakční analýze za použití rentgenového záření.

Pro krystalizaci Nedd4-2³³⁵⁻⁴⁵⁵ v komplexu s 14-3-3 η Δ C byla použita mutantní varianta T367A, aby se zabránilo heterogenitě vzorku. Komplex 14-3-3 η Δ C:Nedd4-2³³⁵⁻⁴⁵⁵T367A byl smíchán v molární stechiometrii 1:2 a přes noc dialyzován proti pufru obsahujícímu 20 mM Tris-HCl pH 7,5 a 1 mM TCEP. Proteinový komplex byl následně zakoncentrován na 11 mg/ml. Krystaly byly poté vypěstovány z kapek sestávajících ze 4 μ l proteinového komplexu, 2 μ l podmínky Morpheus C12 (složené z 0,03 M dusičnanu sodného, 0,03 M fosforečnanu sodného, 0,03 M síranu amonného, 0,1 M bicinu, 12,5 % v/v MPD; 12,5 % PEG 1000; 12,5 % w/v PEG 3350) pH 7,5 a 0,6 μ l 30 % w/v sacharózy (Hampton Research Additive Screen). Krystaly byly před sběrem dat na domácím difraktometru D8 Venture (Bruker, MA, USA) v Centru Molekulární Struktury (CMS) BIOCEV prudce zmrazeny v kapalném dusíku bez další kryoprotekce, neboť tato podmínka sama o sobě vykazovala kryoprotektivní vlastnosti.

3.6. Chemické zesítení spojené s hmotnostní spektrometrií

Chemické zesítení je účinnou metodou, která umožňuje kovalentně spojit části proteinů, které se v roztoku alespoň krátkodobě nacházejí ve své relativní blízkosti. Hmotnostní spektrometrie (MS) zde poté umožňuje přesnou identifikaci pozic zesítených reziduí. Pro větší pokrytí zesítených peptidů identifikovaných hmotnostní spektrometrií bylo v případě proteinu Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ využito více typů homobifunkčních síťovacích činidel, konkrétně DSG, DSS a DSA. Zesítené proteiny byly přes noc štěpeny trypsinem při 37 °C. Peptidy vzniklé trypsinovou proteolýzou byly vstříknuty do kolony Luna Omega 5 μ m Polar C18 100 Å 20 \times 0,3 mm (Phenomenex) a odsoleny rychlostí 20 μ l/min po dobu 5 min. Peptidy byly poté separovány chromatografií na obrácené fázi s kolonou Luna Omega 3 μ m Polar C18 100 Å 150 \times 0,3 mm (Phenomenex) při 10 μ l/min za použití kapilárního systému UHPLC 1290 (Agilent Technologies). Kolona byla zahřáta na 50 °C a přímo připojena k hmotnostnímu spektrometru

15 T solariX XR FT-ICR (Bruker Daltonics, USA). K identifikaci zesíťovaných peptidů byl použit software StavroX (Götze et al., 2012).

3.7. Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS) a strukturní modelování

SAXS je metodou strukturní biologie, která podobně jako proteinová krystalografie, využívá rozptylu rentgenového záření na elektronových obalech atomů. Na rozdíl od proteinové krystalografie nevyžaduje SAXS difraktující krystal, nicméně poskytuje strukturní data jen o velmi nízkém rozlišení (~10-50 Å). SAXS pro strukturní determinaci proteinu Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ byl měřen na synchrotronu v EMBL, DESY (PETRA III, P12 beamline, Německo, Hamburk) v režimu SEC-SAXS za použití kolony Superdex 200 Increase 5/150 GL (GE Healthcare) při průtoku 0.5 ml/min při pokojové teplotě. Koncentrace vzorků byly 2,2 mg/ml pro Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵, 2 mg/ml pro 14-3-3 η a 8,9 mg/ml pro komplex Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵:14-3-3 η (molární stechiometrie 1:2). Data byla poté vyhodnocena a kombinována se vzdálenostmi získanými z chemického zesíťení získaných v rámci samotné molekuly Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ (pro model samotného Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵) a zesíťení mezi oběma proteiny 14-3-3 η a Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ (pro model Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵:14-3-3 η). Výchozí model komplexu byl připraven na základě známých krystalových struktur. Neznámá struktura domény WW4 byla modelována jakožto homologní model pomocí serveru SWISS-MODEL (swissmodel.expasy.org). Prezentovaný model CORAL byl vybrán dle nejnižší hodnoty χ^2 .

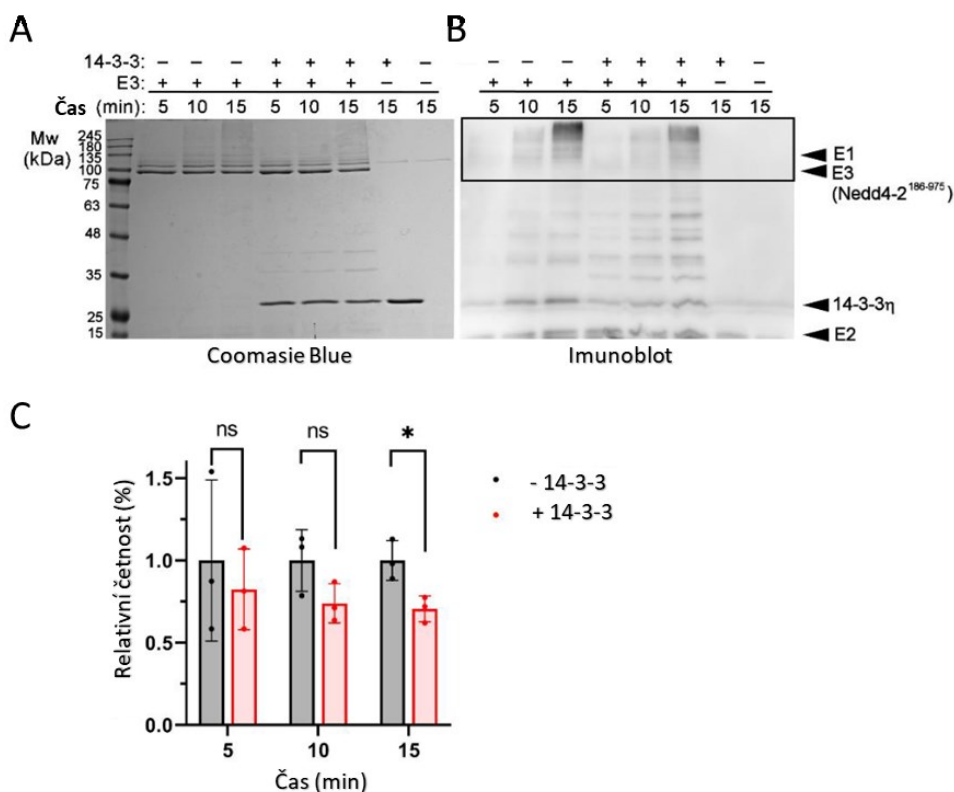
4. Výsledky

4.1. Exprese a purifikace rekombinantních proteinů

Vzhledem k obsáhlosti této kapitoly není možné vytvořit zjednodušené shrnutí postupů pro jednotlivé purifikované rekombinantní proteiny (viz **Tab.: 3.1**). Pro podrobnosti prosím vyhledejte kapitolu **7.1** v hlavním textu disertační práce. Všechny exprimované proteiny se podařilo připravit v požadovaném množství a dostatečné čistotě.

4.2. Autoubikvitinační assay – ověření enzymatické aktivity

Ověření enzymatické aktivity konstruktu Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ je doplňkovým krokem, který ověří funkční stav purifikovaného enzymu (viz **Obr. 4.1**). Zároveň nám umožní pozorovat případné změny v aktivitě proteinu před a po vazbě na protein 14-3-3.

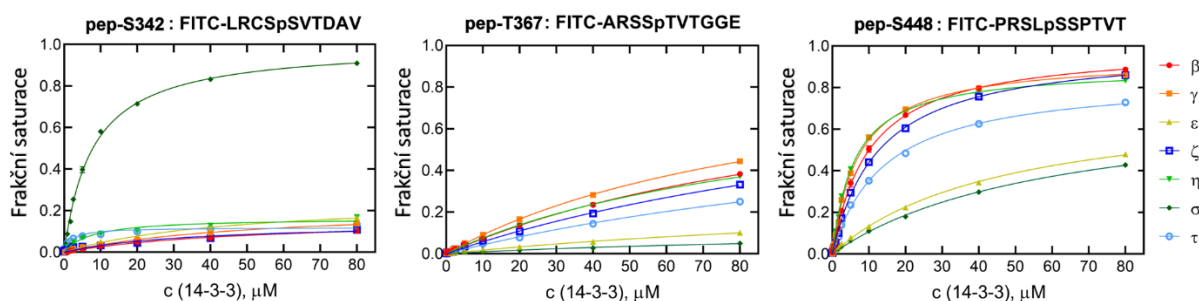


Obr. 4.1: Ověření enzymatické aktivity samotného proteinu Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ a komplexu pNedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵:14-3-3 η . (A) SDS-PAGE standardně vizualizovaný barvou Coomassie Brilliant Blue G-250 a příslušný representativní Ub imunoblot (B) Černý čtverec vyznačuje oblast, která byla denzitometricky analyzována. (C) Relativní četnost ubikvitinovaného–Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ v přítomnosti a nepřítomnosti 14-3-3 z analýzy Ub imunoblotu. Hvězdičky představují významné rozdíly podle nepárového Studentova t-testu porovnávajícího relativní změny mezi vzorky v přítomnosti a nepřítomnosti 14-3-3 η ve vybraných časových bodech (ns, nesignifikantní $P > 0,05$; *, $P < 0,05$).

Výsledky ukazují, že vyprodukovaný protein je aktivní. Vazba proteinu 14-3-3 η vede mírnému snížení katalytické aktivity Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵. Přítomnost ubikvitinovaného proteinu Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ byla poté ověřena servisním pracovištěm hmotnostní spektrometrie v Centru Molekulární Struktury (CMS) BIOCEV.

4.3. Polarizace fluorescence

Pro účel této metody byly syntetizovány fosforylované peptidy o délce 10 aminokyselin s navázanou fluorescenční značkou FITC na N-konci. Experiment byl poté proveden dle postupu pospaného v kapitole 3.3 se všemi sedmi lidskými isoformami proteinů 14-3-3. Na základě těchto výsledků byla pro následné experimenty zvolena isoforma 14-3-3 η , která spolu s 14-3-3 γ vykazuje nejnižší hodnoty K_D (14-3-3 η 6.1 ± 0.5 ; 14-3-3 γ $14.3 \pm 3\gamma$) viz tabulka 4.1. Vazebné křivky pro jednotlivé fosforylované peptidy a isoformy proteinů 14-3-3 jsou prezentovány v Obr. 4.2.



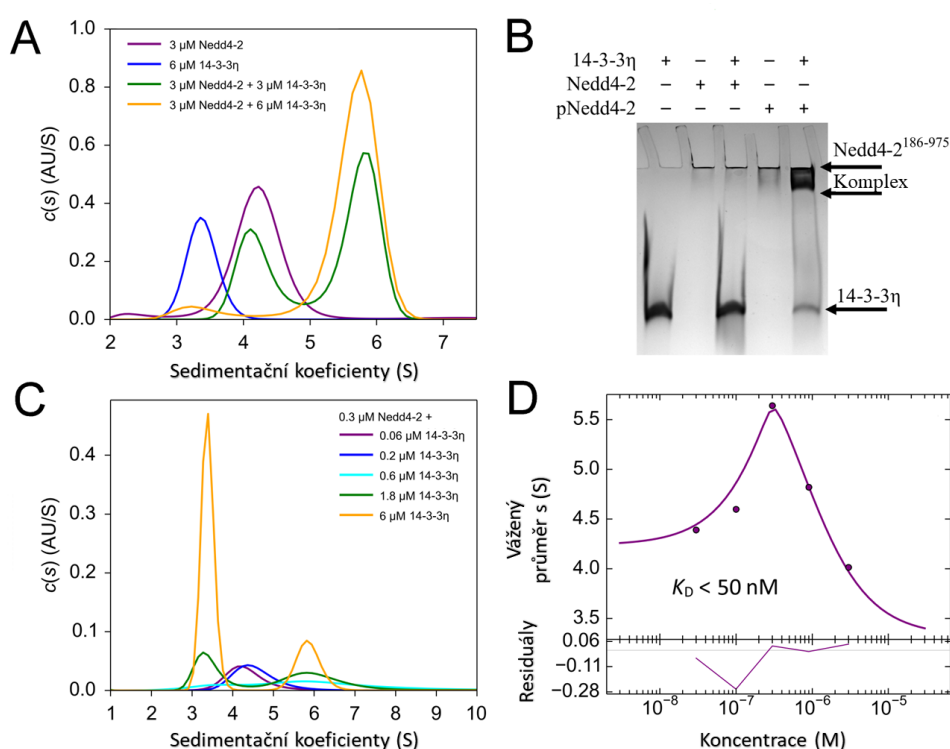
Obr. 4.2: Vazebná specifita jednotlivých isoform proteinů 14-3-3 k fosfomotivům na Nedd4-2 (pS342, pT367 a pS448). Vazba Nedd4-2 fosfopeptidů obsahující vazebné motivy pro 14-3-3 byla charakterizována FP titracemi. Vazebná afinita těchto peptidů byla určena fitem změny polarizace fluorescence pomocí One-site bind modelu. Odpovídající sekvence těchto peptidů jsou uvedeny nad grafy. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD ($n = 3$), směrodatné odchylky.

Tab. 4.1: Výsledné disociační konstanty pro jednotlivé isoformy.

Isoforma	K_D , μM pep-S342	K_D , μM pep-S448
14-3-3 β	—	10.0 ± 1.0
14-3-3 γ	—	7.2 ± 0.7
14-3-3 ϵ	—	50.0 ± 10.0
14-3-3 ζ	—	13.0 ± 1.0
14-3-3 η	—	6.1 ± 0.5
14-3-3 σ	7.8 ± 0.8	60.0 ± 10.0
14-3-3 τ	—	14.0 ± 1.0

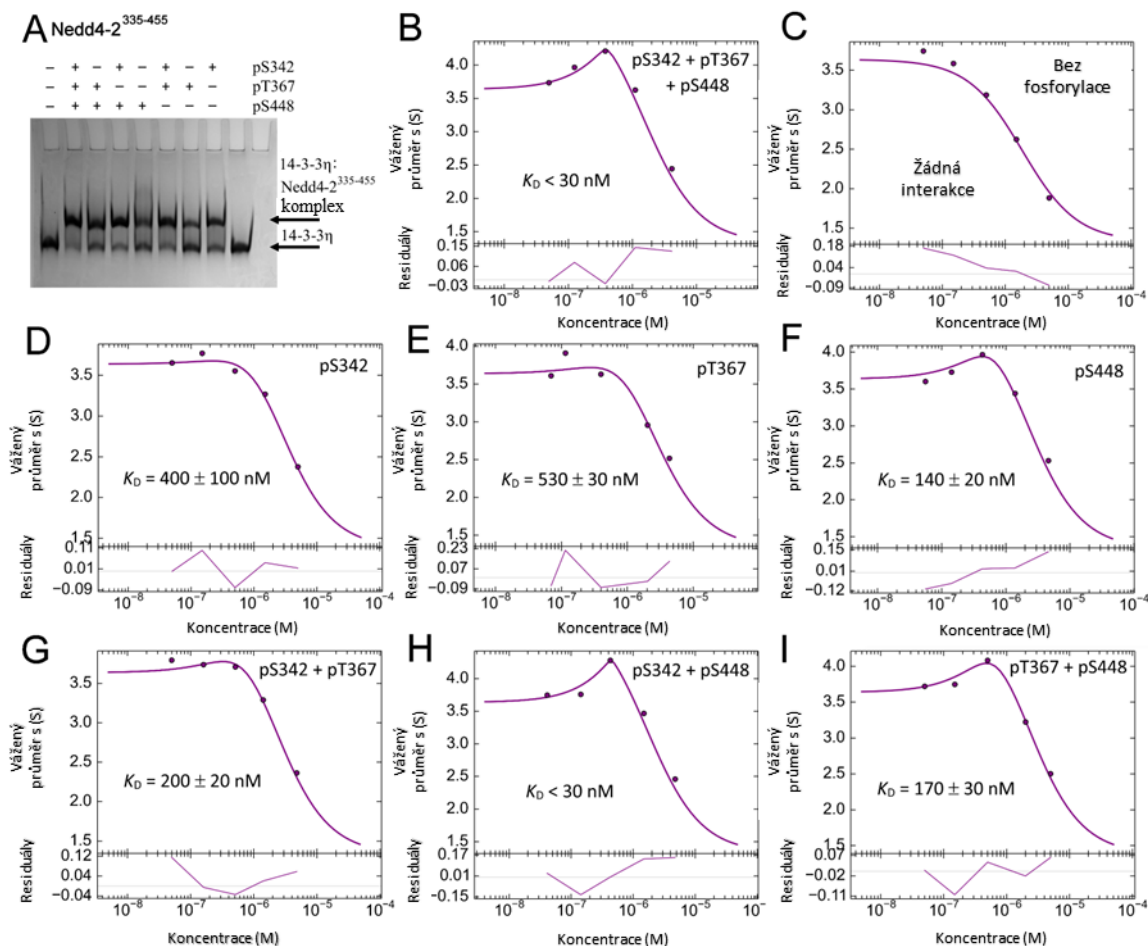
4.4. Ověření interakce proteinu Nedd4-2 s proteiny 14-3-3 *in vitro*

Prvním krokem pokusu o objasnění principů modulační proteinu Nedd4-2 prostřednictvím proteinů 14-3-3 je ověření schopnosti vazby fosforylovaných konstruktů Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ a Nedd4-2³³⁵⁻⁴⁵⁵ na proteiny 14-3-3. K tomu bylo primárně použito metod SV-AUC. První experiment byl proveden s konstruktem Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵. Disociační konstanta komplexu je <50 nM a vazebná stechiometrie je 1:2, tedy 1 molekula Nedd4-2 : 2 molekulám proteinu 14-3-3 (viz Obr. 4.3).



Obr. 4.3: Analýza komplexu pNedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵:14-3-3η. (A) Kontinuální distribuce sedimentačních koeficientů ($c(s)$) samotného 3 μM pNedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ (fialová), samotného 6 μM 14-3-3η (modrá) a komplexu pNedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵:14-3-3η smíchaného v molárním poměru 1:1 (zelená) a 1:2 (žlutá). (B) 12% TBE-PAGE znázorňující tvorbu komplexu mezi pNedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ a 14-3-3η v závislosti na fosforylaci po nanesení 240 pmol 14-3-3η a 120 pmol Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵, či pNedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ na nativní gel. (C) Distribuce sedimentačních koeficientů ($c(s)$) 300 nM pNedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ titrovaného 0,06-6 μM 14-3-3η. (D) Izoterma vážených průměrů sedimentačních koeficientů (s_w) získaných z analýzy SV-AUC směsi 300 nM pNedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ s 0,06-6 μM 14-3-3η.

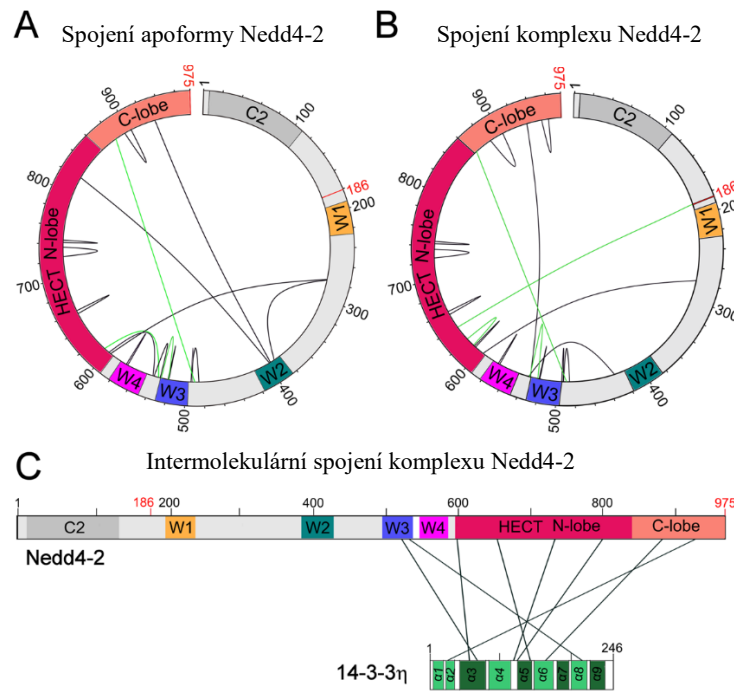
Tento pokus byl poté zopakován s konstruktem Nedd4-2³³⁵⁻⁴⁵⁵ a mutantními variantami tohoto konstruktů obsahující různé kombinace fosforylačních míst (viz **Obr. 4.4**). Vazebná stechiometrie je i v tomto případě vždy 1:2, tedy 1 molekula Nedd4-2 : 2 molekulám proteinu 14-3-3. Disociační konstanty se liší dle počtu fosforylačních míst proteinu Nedd4-2.



Obr. 4.4: Kvalitativní a kvantitativní analýza komplexů mutantů Nedd4-2³³⁵⁻⁴⁵⁵ v komplexu s 14-3-3η. 12% nativní TBE-PAGE zobrazující interakci mezi 14-3-3η (240 pmol) a variantami Nedd4-2³³⁵⁻⁴⁵⁵ s jedním, dvěma nebo třemi fosforylačními místy (120 pmol); samotný protein 14-3-3η byl vložen do předposlední dráhy. Kontrola postrádající fosforylační místa se nachází v dráze první. (B-I) SV-AUC analýza komplexů mezi variantami 14-3-3η a pNedd4-2³³⁵⁻⁴⁵⁵, která ukazuje s_w izotermy 14-3-3η a Nedd4-2 se všemi třemi fosforylačními místy pS342 + pT367 + pS448 (B), bez fosforylačních míst (C), s jedním fosforylačním místem pS342 (D), pT367 (E) a pS448 (F) nebo se dvěma fosforylačními místy (pS342 + pT367 (G), pS342 + pS448 (H) a pT367 + pS448 (I)). Izotermy vážených průměrů sedimentačních koeficientů byly sestaveny prostřednictvím analýzy SV-AUC směsí 1 μM 14-3-3η s variantami Nedd4-2³³⁵⁻⁴⁵⁵ (0,05 - 5 μM).

4.5. Chemické zesítení – mapování strukturálních změn

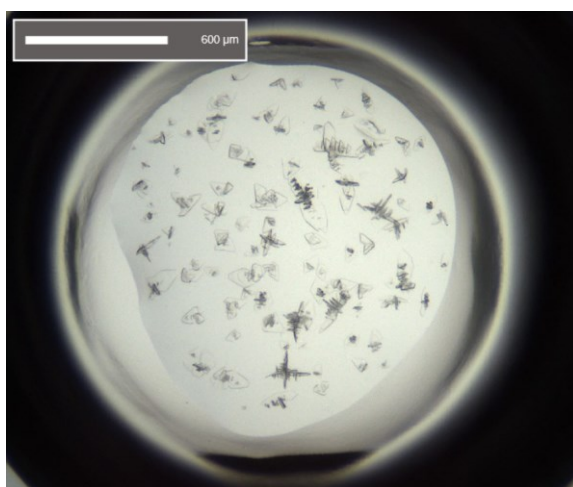
Metodou chemického zesítení kombinovaného s hmotnostní spektrometrií bylo identifikováno celkem 41 různých spojení, která dohromady umožňují mapovat strukturální změny proteinu Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ před a po navázání dimeru proteinu 14-3-3 (viz **Obr. 4.5**) Identifikovaná spojení byla posléze použita pro modelování samotného proteinu Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ a jeho komplexu s proteinem 14-3-3 η .



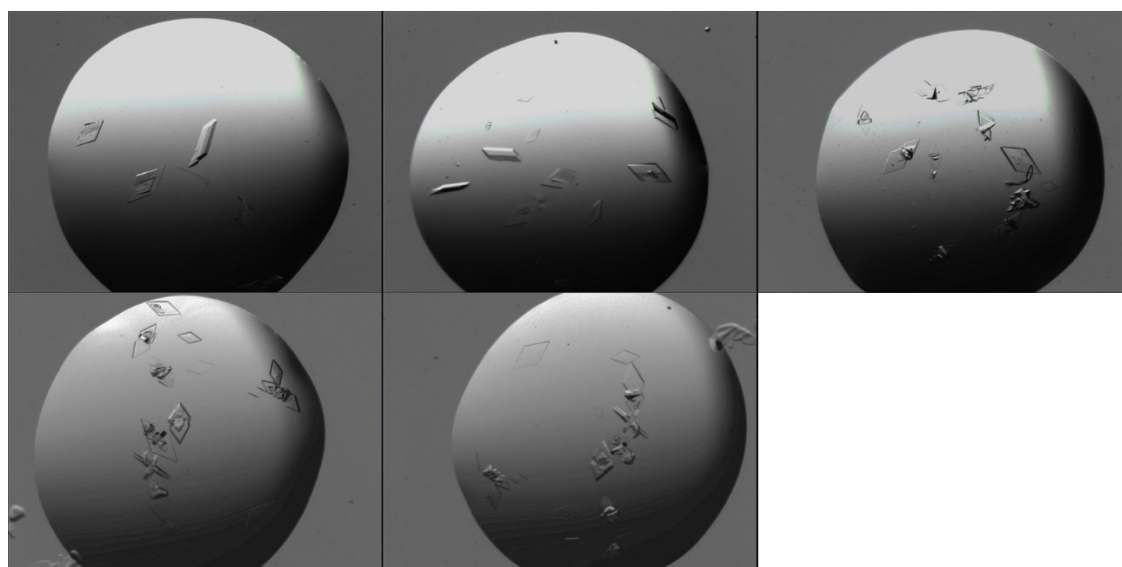
Obr. 4.5: Schéma znázorňující pozice jednotlivých identifikovaných spojení. Spojení pomocí síťovacích činidel DSS a DSG jsou značeny černě. Kvantitativní spojení pomocí DSA jsou značeny světle zeleně. (A) pozice zesítených reziduí, které byly identifikovány v apoformě proteinu Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵. Doména C2 (šedě) v tomto konstruktu není přítomná, WW domény (značeny W1-W4) jsou znázorněny žlutě, tmavě zeleně, modře a fialově, N- a C- část HECT domény označena červenou a lososovou. (B) pozice intramolekulárních spojení identifikovaných na proteinu pNedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ v případě komplexu s 14-3-3 η . (C) Pozice intermolekulárních spojení mezi proteinem 14-3-3 η a pNedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵. Helixy proteinu 14-3-3 jsou označeny zeleně α 1- α 9, tmavou zelenou vyznačeny helixy tvořící vazebný žlábek.

4.6. Proteinová krystalizace

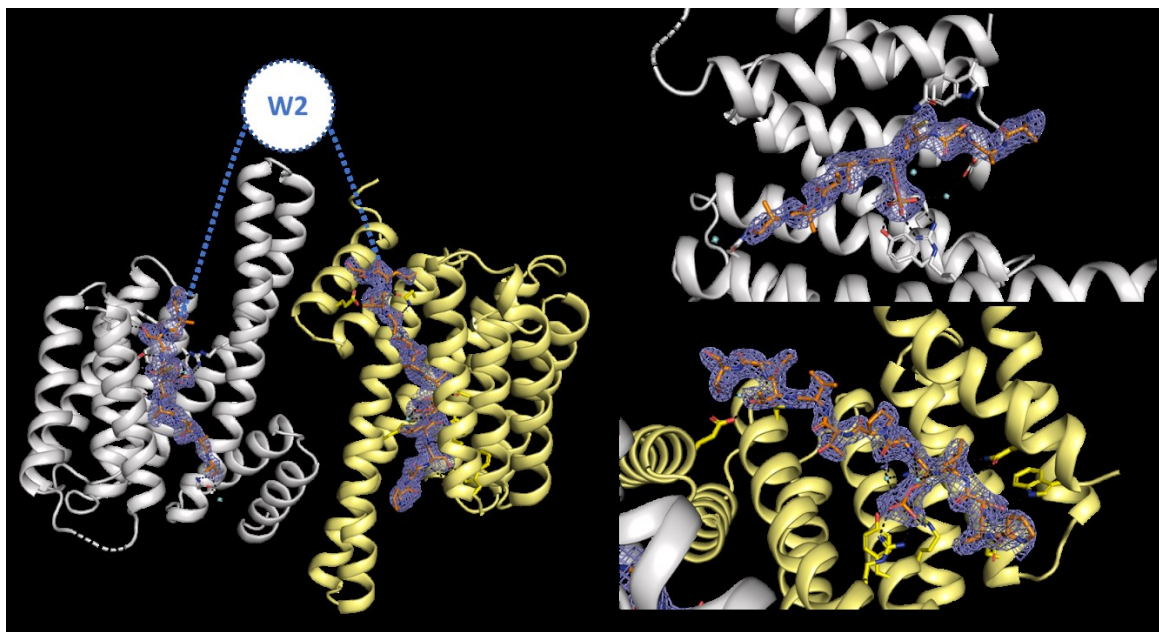
V rámci disertační práce byla představena krystalová struktura komplexu 14-3-3 η Δ C:Nedd4-2³³⁵⁻⁴⁵⁵T367A. Krystalizační podmínka byla nalezena pomocí krystalizačních *screenů* provedených na pracovišti v Centru Molekulární Struktury (CMS) BIOCEV. Vhodné podmínky byly nalezeny v krystalizačním *screenu* Morpheus (podmínka C12, viz **Obr. 4.6**). Nalezená podmínka byla poté dále ručně optimalizována do finální podoby vhodné pro difrakční analýzu (viz **Obr. 4.7**). Výsledná struktura byla vyřešena pomocí molekulárního nahrazení o celkovém rozlišení 2.3 Å.



Obr. 4.6: Počáteční snímek krystalizační podmínky Morpheus C12 před ruční optimalizací.



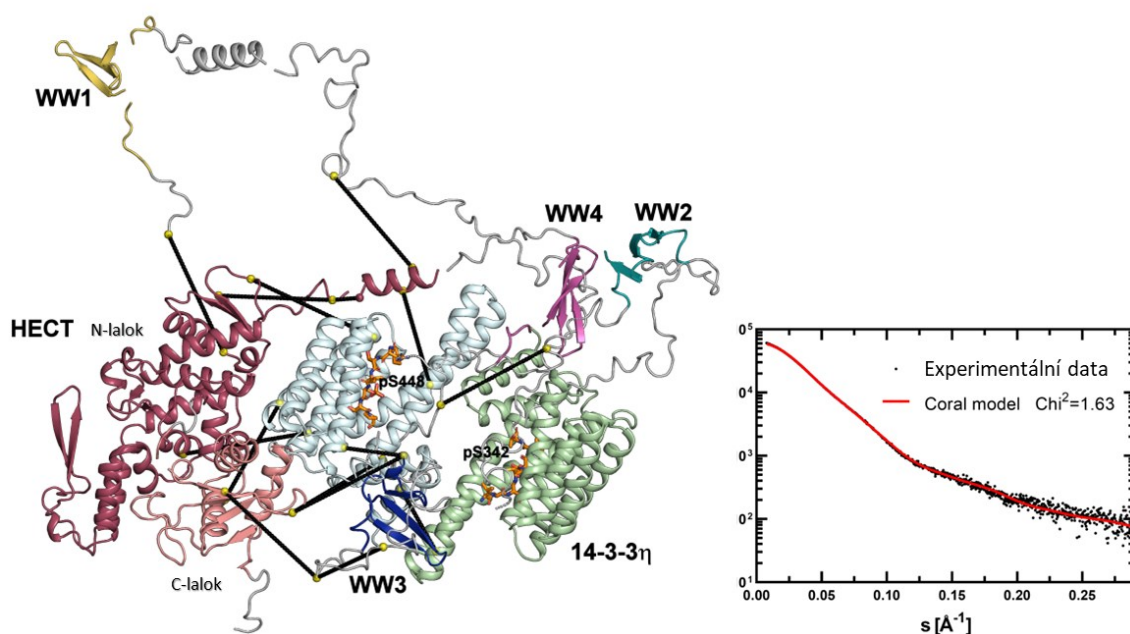
Obr. 4.7: Snímky krystalů komplexu 14-3-3 η Δ C:Nedd4-2³³⁵⁻⁴⁵⁵T367A, které byly podrobeny difrakční analýze. Snímky krystalů byly pořízeny po sedmi dnech od založení kapky, těsně před zamražením v kapalném dusíku.



Obr. 7.22: Krystalová struktura *Nedd4-2³³⁵⁻⁴⁵⁵T367A* (oranžově) obsahující dvě fosforylační místa (pS342 a pS448) vázaná na dimer 14-3-3ηΔC (šedě a žlutě). (A) pohled shora na oba vazebné motivy *Nedd4-2* v obou vazebných žlábcích 14-3-3. Chybějící rezidua a WW2 jsou vyznačeny modrou přerušovanou čarou. (B) detailní pohled na vazebný motiv pS342. (C) Detailní pohled na vazebný motiv pS448. Mapa elektronové hustoty $2F_o-F_c$ je konturována na $0,8\sigma$ (modrá síť). Obrázky struktury byly vytvořeny pomocí programu PYMOL.

4.7. SAXS a modelování komplexu

Předpokládaná flexibilita Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ výrazně komplikuje snahy o krystalizaci tohoto proteinu či jeho komplexů. Tzv. SEC-SAXS poskytl data o dostatečné kvalitě k tomu, abychom mohli sestavit strukturní model na základě známých struktur jednotlivých domén dostupných v PDB databázi, vzdáleností získaných z chemického zesíťení a strukturních informací ze SAXS. Výsledné modely poté umožňují vizualizovat strukturní změny proteinu Nedd4-2 prostřednictvím vazby dimeru proteinu 14-3-3 η (viz **Obr 4.8**).



Obr. 4.8: CORAL model pro komplex pNedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵:14-3-3 η . Vlevo: nejlépe hodnocený model s o hodnotě $\chi^2 = 1,63$. Protomery proteinu 14-3-3 η jsou zobrazeny světle zeleně a bledě modře. V doméně HECT Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ je N-lobe zobrazen tmavě červenou a C-lobe lososovou barvou. Domény WW1, WW2, WW3 a WW4 jsou zobrazeny v barvě žlutá, tiskysová, modrá a fialová. Struktura fosforylovaných peptidů ve vazebných žlábkách je znázorněna oranžově a jsou převzaty ze struktur PDB ID: 6ZBT a 6ZC9. Flexibilní linkery mezi rigidními doménami jsou znázorněny šedě. Ca zesíťovaných reziduí jsou znázorněny jako žluté kuličky. Vpravo: shoda experimentální rozptylové křivky (černě) s teoretickou rozptylovou křivkou modelu (červeně).

5. Diskuse

Hlavním cílem práce bylo rozšířit poznání o strukturní podstatě regulace ubikvitin ligasy Nedd4-2 prostřednictvím proteinů 14-3-3. Tento nelehký úkol byl komplikován značnou strukturní variabilitou proteinu Nedd4-2, jeho nízkou stabilitou v roztoku a také náročností jeho přípravy, která vyžadovala celou řadu optimalizací proteinových konstruktů, hledání vhodných podmínek exprese a také detailní vyladění samotných purifikačních postupů. Přesto se nám v rámci této studie naskytl jedinečný pohled na některé strukturní charakteristiky této ubikvitin ligasy, ať už v apoformě, tak v komplexu s jejím významným regulátorem, dimerním proteinem 14-3-3.

Význam proteinu Nedd4-2 postupně narůstá s tím, jak se proteomickým studiím čím dál efektivněji daří rozplétat složité a komplexní vztahy mezi proteiny a způsoby jejich regulace. S tím, jak se postupně posouvá úroveň našeho poznání, se z proteinu Nedd4-2, zcela exkluzivního regulátoru epiteliálního sodíkového kanálu (ENaC), postupně stává významný regulátor celé řady významných buněčných procesů, s více jak padesáti různými interakčními partnery (Manning a Kumar, 2018). Je pak zcela na místě předpokládat, že ubikvitinace takto široké plejády proteinů bude vyžadovat i precizní způsoby regulace. Přesto zatím víme jen velmi málo o tom, jak je činnost této ubikvitin ligasy regulována.

Jedním z popsaných způsobů regulace proteinu Nedd4-2 je fosforylace, jež vede k vazbě proteinu 14-3-3, čímž je modulována vazebná specificita k některým substrátům (Ichimura et al., 2005; Zhu et al., 2017). Námi připravený Nedd4-2 byl fosforylován kinasou PKA celkem na třech reziduích: Ser³⁴², Thr³⁶⁷ a Ser⁴⁴⁸. Experimenty provedené s fluorescenčně značenými peptidy těchto fosforylovaných vazebných motivů prokázaly, že minimálně v případě vazebného fosfomotivu pS448, je vznik komplexu proteinu Nedd4-2 možný se všemi sedmi lidskými isoformami proteinů 14-3-3, přičemž výrazná preference je patrná pro isoformy 14-3-3 η a 14-3-3 γ ($K_D = 6,1 \pm 0,5 \mu\text{M}$ a $7,2 \pm 0,7 \mu\text{M}$). Vazba ostatních motivů kromě pS448 však byla v tomto experimentu velmi slabá a nebylo zde možné sestrojit spolehlivou křivku aproximující rozdíly v afinitách. Jedinou výjimkou je, velmi překvapivě, isoforma 14-3-3 σ , kde motiv pS342 vykazoval relativně nízkou K_D ($K_D = 7,8 \pm 0,8 \mu\text{M}$). Disociační konstanta pro motiv pS448 zde však v porovnání s ostatními isoformami dosahovala nejvyšších hodnot ($K_D = 60,0 \pm 10,0 \mu\text{M}$). Zdá se tedy, že v tomto případě může být úloha pS342 a pS448 obrácena. Učinění takových závěrů jen na základě peptidů však není možné, vzhledem k nekompletnosti systému. Afinita peptidů může být do značné míry také ovlivněna jejich rozpustností, fluorescenční značkou či přítomností linkeru, jímž je připojena. Isoforma 14-3-3 σ však byla

stejně jako isoformy β , γ , ε , ζ , η a τ identifikována jako *in vivo* vazebný partner Nedd4-2 (Ichimura et al., 2005). Bylo by proto zajímavé prostudovat tento fenomén detailněji, i vzhledem k rozdílným úlohám jednotlivých isoform proteinů 14-3-3 (Ko et al., 2014). Vyšší afinita pS448 k většině isoform 14-3-3 potvrdila preferenci motivů obsahujících Pro na pozici +2 od fosforylačního místa. Sekvence motivu pS448 velmi dobře zapadá do kanonického vazebného módu I. Zbylé dva fosforylované motivy se klasickým vazebným módům proteinů 14-3-3 zcela vymykají (Rittinger et al., 1999).

Vzhledem k tomu, že se značná část 14-3-3 vazebných partnerů váže na 14-3-3 proteiny skrze souběžnou vazbu dvou fosforylovaných míst, předpokládali jsme obdobný mechanismus i v případě proteinu Nedd4-2. Naše SV-AUC experimenty s variantou proteinu Nedd4-2³³⁵⁻⁴⁵⁵ ukázaly, že pro tvorbu komplexu proteinu s K_D v nM oblasti je dostatečná fosforylace na kterémkoliv ze tří fosforylačních míst, přičemž vazebná stechiometrie je ve všech případech 1:2, tedy monomer Nedd4-2 : dimer 14-3-3 η . Fosforylační místo pS448 vykazuje 4x-5x vyšší afinitu k 14-3-3 η , než zbylá dvě fosforylační místa pS342 a pT367. To je v souladu s daty získanými prostřednictvím fluorescenčně polarizačních esejí. V případě pS448 můžeme tedy nejspíše hovořit o tzv. „gatekeeper“ motivu pro většinu z isoform 14-3-3. Souběžná vazba dvou míst pak v případě pS342 a pS448 vedla k velmi silné vazbě s $K_D < 30$ nM, tedy zhruba 5x silněji, než v případě samotného fosforylovaného místa pS448 ($K_D = 140 \pm 20$ nM). Je zajímavé, že simultánní vazba míst pT367 + pS448 vykazuje podobnou, ne-li mírně vyšší K_D (170 ± 30 nM), jako vazba samotného pS448. Je tedy možné, že zde může docházet k nějakému typu kompetice či preference jednoho z obou těchto fosforylačních míst. Afinita jednotlivých fosforylačních míst k proteinu 14-3-3 η je v souladu s daty získaných na *in vivo* systémech (Debonneville et al., 2001; Hallows et al., 2010). Vzhledem k tomu, že dle disociačních konstant mohou všechna tři fosforylační místa hrát zástupnou roli k vazbě na dimer 14-3-3, bylo by na místě prostudovat jejich úlohu mnohem detailněji. Dle článku Chandran et al., 2011 vykazuje Ser⁴⁴⁸ vysokou bazální míru fosforylace, přičemž fosforylace tohoto jediného místa je dostatečná pro inhibici fosforylace ENaC. Je možné, že úloha ostatních míst – Ser³⁴² a Thr³⁶⁷, hraje úlohu ve finálním „ladění“ signálního výstupu, podobně, jako je tomu třeba u polyfosforylovaného proteinu LRRK2 (Sluchanko, 2020).

Proteinová krystalizace komplexu 14-3-3 η Δ C:Nedd4-2³³⁵⁻⁴⁵⁵T367A (PDB ID: 7NMZ) odhalila celou řadu unikátních intermolekulárních kontaktů v oblasti vazebného žlábků dimeru 14-3-3 η . Přesto pro značnou část proteinu Nedd4-2, včetně domény WW2, nebyla v krystalové struktuře nalezena elektronová hustota. Je tedy možné předpokládat, že pozice WW2, alespoň v případě komplexu 14-3-3 η Δ C:Nedd4-2³³⁵⁻⁴⁵⁵T367A, není vůči proteinu 14-3-3 pevně

definována. Doména WW2 tedy mohla být stále volně přístupná pro vazbu případného ligandu. Pokud by tato úvaha byla správná, částečnou odpověď na úlohu jednotlivých fosforylačních míst by mohly přinést krystalové struktury pro kombinaci fosforylačních motivů pT367 a pS448, případně pS342 a pT367. Současná vazba pS448 a pT367 by vzhledem k pozici tohoto místa vedla k o 20 aminokyselin kratšímu linkeru mezi fosforylovaným reziduem navázaným ve vazebném žlábků a doménou WW2. To by mohlo vést k posunu WW2 blíže k proteinu 14-3-3, čímž by mohla být dále ovlivněna přístupnost této sensorické domény pro případné ligandy určené k ubikvitinaci. Naše data tedy v tomto konkrétním případě vyvolávají spíše více otázek než odpovědí.

Ve snaze zmapovat strukturní změny proteinu Nedd4-2, které jsou indukovány vazbou proteinu 14-3-3, jsme provedli experiment kombinující chemické zesílení s hmotnostní spektrometrií. Nejvýznamnější strukturní změny byly detekovány právě v oblasti domény WW2, přičemž po vazbě proteinu 14-3-3 již nebyly dále detekovány spojení mezi doménou WW2 a doménou HECT. Naopak celá řada spojení dokládá možné interakce mezi doménou WW3 a α -helixy vazebného žlábků proteinu 14-3-3. Zajímavá je i pozice spojení mezi prvním α -helixem HECT domény a vnitřní oblasti vazebného žlábků 14-3-3. Tento tzv. α' -helix pravděpodobně hraje významnou roli v regulaci HECT ubikvitin ligas, přičemž se předpokládá, že autoubikvitinace tohoto helixu může vést k oligomerizaci a inaktivaci ubikvitin ligasy (Attali et al., 2017). Vazba 14-3-3 by tak mohla mít přímý dopad na tento konkrétní regulační mechanismus. Dalším významným spojením, které přináší náhled do možných strukturních změn indukovaných 14-3-3 proteiny, je kvantitativní spojení mezi N-koncem Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ a N-koncovou částí HECT domény v případě komplexu se 14-3-3. Toto chemické spojení zcela specifické pro komplex může naznačovat, že po vzniku komplexu se tato oblast stává přístupnou síťovacím činidlům. Zároveň může být dokladem stále trvající autoinhibice, kterou zprostředkovává N-terminální helix proteinu Nedd4-2 nacházející se před doménou WW1 (Wang et al., 2019).

Více informací o strukturních změnách by mohla přinést optimalizace podmínek pro chemické zesílení či použití kratších síťovacích činidel, které by zajistilo hustější pokrytí inter- a intra- molekulárních interakcí. Získaná data však byla dostatečná pro sestavení CORAL modelu na základě SAXS dat, který nám umožnil částečnou vizualizaci těchto strukturních změn. SAXS zároveň odhalil, že maximální délka částice D_{\max} se po vazbě proteinu 14-3-3 takřka nemění. Pozorovatelné rozdíly jsou pouze v poloměru gyrace a celkové flexibilitě částic. SAXS model kombinovaný s chemickým zesílením naznačuje, že princip regulace Nedd4-2 prostřednictvím proteinu 14-3-3 spočívá zejména v zablokování domény WW3 v centrálním

kanálu 14-3-3 proteinu. Tato doména proteinu Nedd4-2 je (v menší míře spolu s WW4) primárně zodpovědná za rozpoznání a ubikvitinaci ENaC (Fotia et al., 2003). Naše *in vitro* data tedy přinášejí možné vysvětlení dějů pozorovaných v živých systémech. Přesná pozice WW2 a WW4 v komplexu je však stále nejasná. Spojení v apoformě Nedd4-2 naznačují její kontakty s doménou HECT. Model komplexu na základě SAXS dat naznačuje, že po navázání 14-3-3 se tato doména nachází volně v prostoru, v blízkém kontaktu s doménou WW4. Vzhledem k tomu, že pro tyto oblasti nebyly nalezené žádné spojení, jsou pozice obou míst spíše spekulativní. Absence spojení může naznačovat jak volnou pozici v prostoru bez dalších interakcí, tak nepřístupnost této oblasti rozpouštědлу a její uzavření dovnitř struktury. Krystalová struktura 14-3-3 Δ C:Nedd4-²³³⁵⁻⁴⁵⁵T367A však mírně naznačuje, že by první z variant mohla více odpovídat realitě.

Velmi zajímavé by bylo zjistit, jaký je vliv N-koncové C2 domény Nedd4-2, které chyběla v použitém konstruktu Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ (kvůli potížím s přípravou proteinu v celé jeho délce). Je předpokládáno, že doména C2 hraje zásadní roli v aktivaci proteinu Nedd4-2, a může hrát zásadní roli v celkovém sbalení této makromolekuly (Escobedo et al., 2014; Fajner et al., 2017; Todaro et al., 2017). Naše experimenty však přinesly první strukturní náhled na podstatu interakce Nedd4-2 s proteiny 14-3-3 a získání detailnějších poznatků bude cílem budoucích experimentů.

6. Závěr

Výsledky našeho výzkumu zaměřeného na regulaci ubikvitin ligasy Nedd4-2 prostřednictvím proteinu 14-3-3 pomocí integrovaných metod strukturní biologie byly zveřejněny ve dvou impaktovaných časopisech, které jsou součástí přílohy k této disertační práci.

Cíle této práce byly plněny následovně:

- 1) Byl připraven stabilní konstrukt proteinu Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ v dostatečném množství a čistotě.
- 2) Konstrukt Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ byl katalyticky aktivní.
- 3) Stechiometrie vazby Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ s proteinem 14-3-3 je 1:2 (monomer Nedd4-2 se váže na dimer proteinu 14-3-3).
- 4) Byl připraven konstrukt Nedd4-2³³⁵⁻⁴⁵⁵ a jeho 8 mutantních forem obsahující žádné, jedno, dvě či tři fosforylační místa, a to v dostatečném množství a čistotě.
- 5) Konstrukt Nedd4-2³³⁵⁻⁴⁵⁵ tvořil komplex se všemi isoformami proteinů 14-3-3. Vazebná stechiometrie je vždy 1:2.
- 6) Měření polarizace fluorescence odhalila preferenci hlavního vazebného motivu Ser⁴⁴⁸ Nedd4-2 pro dvě isoformy proteinů 14-3-3 η a 14-3-3 γ .
- 7) Konstrukt Nedd4-2³³⁵⁻⁴⁵⁵T367A byl vykrytalizován v komplexu s 14-3-3 η Δ C a byla vyřešena jeho struktura s dostatečným rozlišením.
- 8) Mapování strukturních změn proteinu Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ vyvolaných vazbou proteinu 14-3-3 η pomocí chemického zesílení bylo úspěšné. Data byla použita pro *in silico* modelování.
- 9) Strukturní charakterizace proteinu Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ a jeho komplexu s proteinem 14-3-3 η za použití metody SAXS byla úspěšná. Data byla použita pro *in silico* modelování.
- 10) Kombinace dat z obou předchozích cílů práce umožnila sestavit strukturní model, ilustrující změny proteinu Nedd4-2 indukované vazbou proteinu 14-3-3 η .

7. Souhrn

Souhrn

Cílem této disertační práce byla strukturní a biofyzikální charakterizace proteinu Nedd4-2 a jeho komplexu s proteiny 14-3-3. Protein Nedd4-2 je lidskou ubikvitin ligasou, která hraje významnou roli v ubikvitinaci širokého spektra membránových proteinů, jakými jsou například membránové kanály (ENaC, Navs), membránové transportéry (GLT-1, NCC) či membránové receptory (AMPA). Nedd4-2 také ubikvitinuje celou řadu kináz (WNK, SYK) a více jak 50 dalších proteinů, čímž se významně podílí na udržování homeostázy organismu. Lze tedy předpokládat, že ubikvitinace takového množství substrátů vyžaduje i precizní úroveň regulace. Jedním ze známých regulačních mechanismů je fosforylace proteinu Nedd4-2 na třech fosforylačních místech: Ser³⁴², Thr³⁶⁷ a Ser⁴⁴⁸, která vede k vazbě dimerního proteinu 14-3-3 a následné modulaci jeho substrátové specificity. Nedd4-2 samotný, stejně tak jako jeho komplex s proteiny 14-3-3, však dosud nebyl strukturně charakterizován.

Výsledky publikované v rámci této disertační práce naznačují, že ubikvitin ligasa Nedd4-2 je v roztoku monomerní a fosforylace tohoto proteinu za použití PKA vede k vazbě na proteiny 14-3-3, a to ve stechiometrii 1:2 (tedy jedna molekula fosforylovaného proteinu Nedd4-2 na dimer proteinu 14-3-3 η). Dominantním vazebným místem je fosforylovaný Ser⁴⁴⁸ a nejstabilnější komplex vzniká při současné fosforylaci Ser³⁴² a Ser⁴⁴⁸. Simultánní vazba fosforylovaných Ser³⁴² a Ser⁴⁴⁸ byla odhalena i v krystalové struktuře komplexu 14-3-3 η Δ C:Nedd4-2³³⁵⁻⁴⁵⁵T367A, která obsahuje minimalistický konstrukt fosforylovaného proteinu Nedd4-2. Fosforylace kteréhokoliv z těchto tří fosforylačních míst je však dostatečná pro vznik komplexu s proteiny 14-3-3.

Modelování na základě SAXS dat, známých krystalových struktur jednotlivých domén a vzdáleností získaných z chemického zesílení spojeného s MS naznačilo rozsáhlé změny ve vzájemných interakcích mezi jednotlivými doménami proteinu Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵, jež byly indukované vazbou proteinu 14-3-3 η . Data naznačují, že doména WW3, která je primárně zodpovědná za rozpoznávání membránového kanálu ENaC, je po vzniku komplexu blokována v centrálním kanálu dimerního proteinu 14-3-3. Tento poznatek tak naznačuje možný mechanismus inhibičního účinku proteinů 14-3-3 na ubikvitinaci výše zmíněného substrátu. Publikovaná data tedy poskytují první strukturní náhled na problematiku regulace proteinu Nedd4-2 prostřednictvím proteinů 14-3-3 a mohou tak být odrazovým můstkem pro budoucí projekty v naší laboratoři.

Summary

The aim of this dissertation was the structural and biophysical characterization of Nedd4-2 protein and its complex with 14-3-3 proteins. The Nedd4-2 protein is a human ubiquitin ligase that plays an important role in the ubiquitination of a wide range of membrane proteins such as membrane channels (ENaC, Navs), membrane transporters (GLT-1, NCC) and membrane receptors (AMPA). Nedd4-2 also ubiquitinates a variety of kinases (WNK, SYK) and more than 50 other proteins, thus contributing significantly to the maintenance of homeostasis. Therefore, it can be assumed that ubiquitination of such a large number of substrates also requires a precise level of regulation. One of the known regulatory mechanism is the phosphorylation of the Nedd4-2 protein at three phosphorylation sites: Ser³⁴², Thr³⁶⁷ and Ser⁴⁴⁸, which leads to the binding of the dimeric 14-3-3 protein and subsequent modulation of its substrate specificity. However, Nedd4-2 itself, as well as its complex with 14-3-3 proteins, has not yet been structurally characterized.

The results published within this thesis suggest that the ubiquitin ligase Nedd4-2 is monomeric in solution and phosphorylation of this protein using PKA leads to binding to 14-3-3 proteins in a 1:2 stoichiometry (i.e. one molecule of phosphorylated Nedd4-2 protein per dimer of 14-3-3 η protein). The dominant binding site is phosphorylated Ser⁴⁴⁸, and the most stable complex is formed when Ser³⁴² and Ser⁴⁴⁸ are phosphorylated simultaneously. Simultaneous binding of phosphorylated Ser³⁴² and Ser⁴⁴⁸ was also revealed in the crystal structure of the 14-3-3 Δ C:Nedd4-2³³⁵⁻⁴⁵⁵T367A complex, which contains a minimalistic construct of phosphorylated Nedd4-2 protein. However, phosphorylation of any of these three phosphorylation sites is sufficient to form a complex with the 14-3-3 protein.

Modeling based on SAXS data, known crystal structures of individual domains and distance constraints obtained from MS coupled with chemical crosslinking indicated extensive changes in the interactions between the domains of the Nedd4-2¹⁸⁶⁻⁹⁷⁵ protein induced by the binding of the 14-3-3 η protein. The data suggest that the WW3 domain, which is primarily responsible for recognition of membrane channel ENaC, is blocked in the central channel of the dimeric 14-3-3 protein after complex formation. This finding suggests a possible mechanism for the inhibitory effect of 14-3-3 protein on ubiquitination of this particular substrate. Published data therefore provide the first structural glimpse into mechanisms of Nedd4-2 regulation by 14-3-3 proteins and can thus be a stepping stone for follow-up projects in our laboratory.

8. Použitá literatura

- Attali, I., Tobelaim, W.S., Persaud, A., Motamedchaboki, K., Simpson-Lavy, K.J., Mashahreh, B., Levin-Kravets, O., Keren-Kaplan, T., Pilzer, I., Kupiec, M., Wiener, R., Wolf, D.A., Rotin, D., Prag, G., 2017. Ubiquitylation-dependent oligomerization regulates activity of Nedd4 ligases. *EMBO J.* 36, 425–440. <https://doi.org/10.15252/embj.201694314>
- Chandran, S., Li, H., Dong, W., Krasinska, K., Adams, C., Alexandrova, L., Chien, A., Hallows, K.R., Bhalla, V., 2011. Neural Precursor Cell-expressed Developmentally Down-regulated Protein 4-2 (Nedd4-2) Regulation by 14-3-3 Protein Binding at Canonical Serum and Glucocorticoid Kinase 1 (SGK1) Phosphorylation Sites *. *J. Biol. Chem.* 286, 37830–37840. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.293233>
- Cole, J.L., Lary, J.W., Moody, T., Laue, T.M., 2008. Analytical Ultracentrifugation: Sedimentation Velocity and Sedimentation Equilibrium. *Methods Cell Biol.* 84, 143–179. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(07\)84006-4](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(07)84006-4)
- Debonneville, C., Flores, S.Y., Kamynina, E., Plant, P.J., Tauxe, C., Thomas, M.A., Münster, C., Chraïbi, A., Pratt, J.H., Horisberger, J.-D., Pearce, D., Loffing, J., Staub, O., 2001. Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na⁺ channel cell surface expression. *EMBO J.* 20, 7052–7059. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.7052>
- Escobedo, A., Gomes, T., Aragón, E., Martín-Malpartida, P., Ruiz, L., Macias, M.J., 2014. Structural Basis of the Activation and Degradation Mechanisms of the E3 Ubiquitin Ligase Nedd4L. *Structure* 22, 1446–1457. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.08.016>
- Fajner, V., Maspero, E., Polo, S., 2017. Targeting HECT-type E3 ligases – insights from catalysis, regulation and inhibitors. *FEBS Lett.* 591, 2636–2647. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12775>
- Fotia, A.B., Dinudom, A., Shearwin, K.E., Koch, J., Korbmacher, C., Cook, D.I., Kumar, S., 2003. The role of individual Nedd4-2 (KIAA0439) WW domains in binding and regulating epithelial sodium channels. *FASEB J.* 17, 70–72. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0497fje>
- Götze, M., Pettelkau, J., Schaks, S., Bosse, K., Ihling, C.H., Krauth, F., Fritzsche, R., Kühn, U., Sinz, A., 2012. StavroX—A Software for Analyzing Crosslinked Products in Protein Interaction Studies. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 23, 76–87. <https://doi.org/10.1007/s13361-011-0261-2>
- Hallows, K.R., Bhalla, V., Oyster, N.M., Wijngaarden, M.A., Lee, J.K., Li, H., Chandran, S., Xia, X., Huang, Z., Chalkley, R.J., Burlingame, A.L., Pearce, D., 2010. Phosphopeptide Screen Uncovers Novel Phosphorylation Sites of Nedd4-2 That Potentiate Its Inhibition of the Epithelial Na⁺ Channel. *J. Biol. Chem.* 285, 21671–21678. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.084731>
- Ichimura, T., Yamamura, H., Sasamoto, K., Tominaga, Y., Taoka, M., Kakiuchi, K., Shinkawa, T., Takahashi, N., Shimada, S., Isobe, T., 2005. 14-3-3 Proteins Modulate the Expression of Epithelial Na⁺ Channels by Phosphorylation-dependent Interaction with Nedd4-2 Ubiquitin Ligase *. *J. Biol. Chem.* 280, 13187–13194. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412884200>
- Ko, S., Kim, J.Y., Jeong, J., Lee, J.E., Yang, W.I., Jung, W.H., 2014. The Role and Regulatory Mechanism of 14-3-3 Sigma in Human Breast Cancer. *J. Breast Cancer* 17, 207–218. <https://doi.org/10.4048/jbc.2014.17.3.207>
- Manning, J.A., Kumar, S., 2018. Physiological Functions of Nedd4-2: Lessons from Knockout Mouse Models. *Trends Biochem. Sci.* 43, 635–647. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.06.004>
- Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L.C., Smerdon, S.J., Gamblin, S.J., Yaffe, M.B., 1999. Structural Analysis of 14-3-3 Phosphopeptide Complexes Identifies a Dual Role for the Nuclear Export Signal of 14-3-3 in Ligand Binding. *Mol. Cell* 4, 153–166. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80363-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80363-9)
- Sluchanko, N.N., 2020. Reading the phosphorylation code: binding of the 14-3-3 protein to multivalent client phosphoproteins. *Biochem. J.* 477, 1219–1225. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200084>
- Todaro, D.R., Augustus-Wallace, A.C., Klein, J.M., Haas, A.L., 2017. The mechanism of neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 4-2 (Nedd4-2)/NEDD4L-catalyzed polyubiquitin chain assembly. *J. Biol. Chem.* 292, 19521–19536. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.817882>
- Wang, Z., Liu, Z., Chen, X., Li, J., Yao, W., Huang, S., Gu, A., Lei, Q.-Y., Mao, Y., Wen, W., 2019. A multi-lock inhibitory mechanism for fine-tuning enzyme activities of the HECT family E3 ligases. *Nat. Commun.* 10, 3162. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11224-7>
- Zhu, J., Lee, K.Y., Jewett, K.A., Man, H.-Y., Chung, H.J., Tsai, N.-P., 2017. Epilepsy-associated gene Nedd4-2 mediates neuronal activity and seizure susceptibility through AMPA receptors. *PLOS Genet.* 13, e1006634. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006634>

Seznam publikací:

Publikace *in extenso*, které jsou součástí disertace:

Pohl, P., Joshi, R., Petrvalská, O., Obsil, T., Obsilová, V., 2021. 14-3-3-protein regulates Nedd4-2 by modulating interactions between HECT and WW domains. *Commun. Biol.* **4**, 899. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02419-0> (IF = 6.548)

Joshi, R., **Pohl, P.**, Strachotová, D., Herman, P., Obsil, T., Obsilová, V., 2022. Nedd4-2 binding to 14-3-3 modulates the accessibility of its catalytic site and WW domains. *Biophys. J.* **121**, 1299–1311. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.02.025> (IF = 4.033)