UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

STUDIUM STRUKTURY A INTERAKCÍ VYBRANÝCH FORKHEAD TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ

Structure and interactions of selected forkhead transcription factors

Diplomová práce

studijního oboru Fyzikální chemie

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

Konzultant: RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.

Praha 2020

Bc. Klára Kohoutová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně za vedení školitele prof. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D. a že jsem řádně citovala všechny použité zdroje. Dále prohlašuji, že tato diplomová práce nebyla použita k získání jiného ani stejného titulu. Jsem si vědoma toho, že využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 12.6.2020 _____

Tato práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru podpořeného Grantovou agenturou České republiky, 17-33854.

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli prof. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. a své konzultantce RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D. za odborné vedení při práci na mém diplomovém projektu. Svému školiteli dále děkuji za cenné rady a motivaci v průběhu řešení projektu.

Děkuji RNDr. Kataríně Pšenákové, Ph.D. za předání cenných zkušeností s NMR experimenty, za pomoc a spolupráci při řešení struktury DBD FOXO1.

Dále děkuji Ing. Václavu Veverkovi, Ph.D. za pomoc a odborné vedení při řešení NMR struktury DBD FOXO1, za cenné rady a poskytování konzultací v průběhu celé práce.

Děkuji Mgr. Lukáši Vrzalovi, Ph.D. a RNDr. Pavlu Srbovi, Ph.D. za asistenci při měření STD experimentů.

Děkuji celému Oddělení strukturní biologie RNDr. Pavlíny Maloy Řezáčové, Ph.D., Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i., za poskytnutí času pro naměření nemalého množství NMR experimentů.

Děkuji skupině Organokatalýzy a enantioselektivní syntézy, PřF UK, vedené doc. RNDr. Janem Veselým, Ph.D. za syntézu inhibitorů. Jmenovitě děkuji Mgr. Vojtěchu Dočekalovi za syntézu derivátů sloučeniny S9.

Dále děkuji oběma kolektivům oddělení pediatrie, Department of Pediatrics I a Department of Pediatrics II, Medizinische Universität Innsbruck, Austria, za spolupráci na projektu.

Děkuji celému kolektivu Laboratoře biofyzikální chemie, PřF UK, a Oddělení proteinových struktur Fyziologického ústavu AV ČR v.v.i. za vytvoření přátelského prostředí.

Děkuji svému příteli Mgr. Pavlu Pohlovi za podporu a cenné připomínky k textu práce.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a blízkým za poskytnutí zázemí a podporu po celou dobu studia.

Abstrakt

Tato magisterská práce vznikla jako součást projektu, jehož cílem je vývoj a studium nízkomolekulárních látek schopných inhibovat aktivitu transkripčního faktoru FOXO3. FOXO3 tvoří spolu s FOXO1, FOXO4 a FOXO6 FOXO podrodinu forkhead rodiny transkripčních faktorů. FOXO transkripční faktory jsou evolučně konzervované proteiny, které se účastní regulace celé řady buněčných dějů, mezi něž spadá regulace apoptózy, buněčného cyklu a metabolismu. Díky své proapototické funkci a schopnosti blokovat buněčný cyklus jsou FOXO proteiny považovány za tumorové supresory. Nicméně se ukazuje, že jejich zvýšená aktivita souvisí s mnoha typy rakovinného bujení. FOXO proteiny působí jako regulátory buněčné homeostáze, zvyšují odolnost nádorů vůči chemoterapii a podporují jejich růst. Cílem tohoto projektu je vyvinout specifické inhibitory schopné vázat se na DNA-vazebnou doménu, zkráceně DBD (z angl. DNA-binding domain, residua 156–269), FOXO3 a znemožnit tak její vazbu na DNA. Vývoj specifických inhibitorů FOXO3 vyžaduje znalost struktury DBD všech FOXO proteinů a detailní znalost jejich interakce s DNA. Doposud jsou známy struktury komplexů DNA s DBD FOXO1, FOXO3, FOXO4 a struktury volných DBD FOXO3 a FOXO4. V této práci byla vyřešena struktura volné DBD FOXO1. V předchozí práci byla studována sloučenina S9, která je schopna vázat se na DNA-vazebný povrch DBD FOXO3 a inhibovat tak vazbu FOXO3 na DNA. V této práci byla testována řada derivátů původní sloučeniny S9, jakožto potenciálních inhibitorů interakce DBD FOXO3 s DNA. Jejich inhibiční schopnost byla sledována pomocí nativní elektroforézy. Interakce inhibitorů s DBD FOXO3 byla studována pomocí 2D ^{1}H-^{15}N HSQC a 1D ^{1}H STD NMR experimentů a vizualizována pomocí molekulového dokování. Výsledky ukázaly, že nově syntetizované inhibitory interagují s DBD FOXO3 a jsou schopny inhibovat její vazbu na DNA.

Abstract

This diploma thesis is a part of a project aiming to develop and study specific inhibitors of FOXO3 transcriptional activity. FOXO3 belongs together with FOXO1, FOXO4 and FOXO6 to FOXO subfamily of forkhead family transcription factors. FOXO transcription factors are evolutionary conserved proteins playing important roles in numerous cellular processes, such as apoptosis, cell cycle regulation and metabolism. Due to their ability to induce apoptosis and to block the cell cycle they are considered tumor suppresors. However, it has been shown that increased activity of FOXO proteins is connected with many kinds of cancer. In such cases FOXO proteins function to maintain cell homeostasis. They promote tumor resistance against chemotherapy as well as they speed up its growth. The aim of this project is to develop specific inhibitors able to bind to FOXO3 DNA-binding domain (DBD, residues 156–269) and to block its interaction with target DNA. Development of specific inhibitors of FOXO3 transcriptional programme requires knowledge of solution structure of all FOXO DBDs and detailed insight into their interaction with target DNA. So far crystal structures of complexes of FOXO1, FOXO3 and FOXO4 with target DNA and solution NMR structures of apo DBDs of FOXO3 and FOXO4 have been solved. One of the goals of this diploma thesis was to solve the solution structure of apo DBD of FOXO1 transcription factor. In previous, already published, work, a low molecular compound S9 was identified as an inhibitor of FOXO3 DNA-binding activity. S9 compound binds within the FOXO3 DNA-binding surface and therefore disrupts its interaction with the target DNA. In this work a small library of S9 derivatives was studied as potential inhibitors of FOXO3:DNA interaction. The ability of these low-molecular compounds to disrupt FOXO3:DNA interaction was investigated using native gel electrophoresis. Interactions between inhibitors and FOXO3 DBD were observed and characterized using 2D ^{1}H-^{15}N HSQC and ^{1}H STD NMR experiments and futher visualised using molecular docking methods. The results have shown that S9 derivatives are able not only to interact with FOXO3 DBD but also to inhibit its interaction with the target DNA.

Obsah

Seznam použitých zkratek 9

1 Úvod 14

2 Literární přehled 15

2.1 Transkripce 15

2.1.1 Regulace transkripce prostřednictvím transkripčních faktorů 16

2.2 FOXO transkripční faktory 18

2.2.1 FOXO1 19

2.2.2 FOXO3 20

2.2.3 FOXO4 20

2.3 Regulace funkce FOXO transkripčních faktorů 20

2.3.1 Regulace prostřednictvím posttranslačních modifikací 21

2.3.2 Ostatní mechanismy regulace 24

2.4 Struktura DBD FOXO proteinů 25

2.5 Vazba DBD FOXO proteinů na DNA 26

2.5.1 Interakce DBD FOXO3 s DNA 28

2.6 Selektivní inhibice transkripčních faktorů 29

2.6.1 Strategie přímé inhibice 30

2.6.2 Inhibice forkhead transkripčních faktorů 30

3 Cíle práce 33

4 Materiál 34

4.1. Seznam chemikálií 34

4.2 Použité přístroje 35

4.3 Ostatní pomůcky 36

5 Metody 37

5.1 Exprese a purifikace DBD proteinů FOXO1 a FOXO3 37

5.1.1 Exprese DBD FOXO1 a FOXO3 37
5.1.2.Purifikace 38
5.2 Metody řešení proteinové struktury pomocí NMR 42
5.2.1 Příprava vzorku pro řešení struktury DBD FOXO1 43
5.2.2 Přiřazení rezonancí hlavního řetězce 43
5.2.3 Přiřazení rezonancí postranních řetězců aminokyselin 49
5.2.4 Experimenty založené na NOE 51
5.2.5 Výpočet struktury 52
5.3 Studium inhibitorů interakce FOXO3 s DNA 53
5.3.1 Studované inhibitory a odhad koncentrace jejich nasycených roztoků 53
5.3.2 Nativní elektroforéza 56
5.3.3 Využití změn chemického posunu, CSP, pro mapování vazby ligandu 57
5.3.4 STD experiment 59
5.3.5 Molekulové dokování 60
6 Výsledky 62
6.1 Řešení struktury DBD FOXO1 pomocí NMR 62
6.1.1 Exprese DBD FOXO1 62
6.1.2 Purifikace DBD FOXO1 62
6.1.3 NMR experimenty 65
6.1.4. Struktura DBD FOXO1 67
6.2 Studium a charakterizace inhibitorů interakce FOXO3 s DNA 67
6.2.1 Exprese DBD FOXO3 67
6.2.2 Purifikace DBD FOXO3 68
6.2.3 Odhad koncentrace nasycených roztoků inhibitorů 71
6.2.4 Nativní elektroforéza 71
6.2.5 Studium interakce derivátů sloučeniny S9 s DBD FOXO3 73

6.2.6 Identifikace vazebného povrchu pro sloučeninu S9_19 a charakterizace její interakce s DBD FOXO3 73
6.2.7 Identifikace vazebného povrchu pro sloučeninu S9_20 a charakterizace její interakce s DBD FOXO3 79
6.2.8 Identifikace vazebného povrchu pro sloučeninu S9a_4 a charakterizace její interakce s DBD FOXO3 82
6.2.9 Identifikace vazebného povrchu pro sloučeninu S9a_6 a charakterizace její interakce s DBD FOXO3 84
7 Diskuze 87
8 Závěr 91
9 Seznam citované literatury 92
10 Přílohy 103
Seznam příloh 103
Obr. 10.1 Tkáňová specifita FOXO proteinů. 104
10.2 Mapa plazmidu a sekvence proteinů 105
10.3 Tabulky se složením použitých roztoků a pufrů 106
10.4 ^{1}H-^{15}N HSQC spektra 110
10.5 STD spektra 115
10.6 Validační zpráva ke struktuře DBD FOXO1 120
10.7 Publikace "Forkhead Domains of FOXO Transcription Factors Differ in both Overall Conformation and Dynamics" 149

Seznam použitých zkratek

A	adenin
AFX	bývalá zkratka pro protein FOXO4 (z angl. acute leukemia fusion gene located in chromosome X)
AMP	adenosinmonofosfát (z angl. adenosine monophosphate)
Akt	serin/threonin proteinkinasa Akt (z angl. thymomas of AKR mice)
AMPK	AMP-aktivovaná proteinkinasa
ATP	adenosintrifosfát (z angl. adenosine triphosphate)
C	cytosin
Candid	protokol pro výpočet struktury na základě NMR dat (z angl. Combined automated NOE assignment and structure determination module)
CBB G-250	Coomassie Brilliant Blue G-250 modré barvivo na gely
CBCA(CO)NH	3D NMR experiment, korelace chemického posunu amidického N a H atomu s posunem C_α a C_β atomů i−1 aminokyseliny
CBP	CREB-vazebný protein (z angl. CREB binding protein)
CC(CO)NH	3D NMR experiment, korelace chemického posunu amidického N a H atomu s chemickým posunem všech C atomů i−1 aminokyseliny
CR1	konzervovaný region 1 (z angl. conserved region 1)
CSP	perturbance/změna chemického posunu (z angl. chemical shift perturbation)
DBD	DNA-vazebná doména (z angl. DNA-binding domain)
DBE	daf-16 DNA-vazebný motiv (z angl. daf-16 family binding element)
dH_2O	deionizovaná voda
DMSO	dimethylsulfoxid

DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
DNA-IRE	DNA obsahující IRE motiv nukleotidů
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
F	fenylalanin
FKHR	stará zkratka pro protein FOXO1 (z angl. forkhead in rhabdomyosarcomas)
FKHLR1	stará zkratka pro FOXO3 (z angl. FKHR-like protein 1)
FOX	forkhead rodina transkripčních faktorů (z angl. forkhead box)
FOXO	O podrodina forkhead rodiny transkripčních faktorů
FOXO1	transkripční faktor 1 FOXO podrodiny transkripčních faktorů
FOXO3	transkripční faktor 3 FOXO podrodiny transkripčních faktorů
FOXO4	transkripční faktor 4 FOXO podrodiny transkripčních faktorů
FOXO6	transkripční faktor 6 FOXO podrodiny transkripčních faktorů
G	guanin
GST	glutathion S-transferasa
H	histidin
H1–H4	α-helix 1–4 DNA-vazebné domény forkhead proteinů
HBHA(CO)NH	3D NMR experiment, korelace chemických posunů H_β a H_α atomů i−1 aminokyseliny s chemickými posuny amidického N a H atomu i-té aminokyseliny
HCCH-TOCSY	3D experiment, korelace chemických posunů C-H skupiny s chemickými posuny všech H atomů i-té aminokyseliny (z angl. total correlation spectroscopy)

HMQC ..... heteronukleární multikvantová koherence (z angl. heteronuclear multiple quantum coherence)

HNCACB ..... 3D NMR experiment, korelace chemických posunů amidického N a H atomu s chemickými posunyC_α a C_β i-té a i−1 aminokyseliny)

HN(CA)CO ..... 3D NMR experiment, korelace chemického posunu amidického N a H atomu schemickými posuny kabonylových C atomů i-té a i−1 aminokyseliny

HNCO ..... 3D NMR experiment, korelace chemického posunu amidického N a H atomu s chemickým posunem kabonylového C atomu i−1 aminokyseliny

HSQC ..... heteronukleární jedno-kvantová koherence (z angl. heteronuclear single quantum coherence)

IPTG isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid

IRE ..... insulin responsivní element (DNA-vazebný motiv)

JNK ..... JNK kinasa (z angl. c-Jun N-terminal kinase)

K ..... lysin

LB médium ..... médium podle Luria-Bertani

L ..... leucin

M ..... methionin

MDM2 ..... MDM2 E3 ubikvitin ligasa (z angl. mouse double minute 2 homolog)

miRNA ..... micro-RNA

MST1 ..... MST1 kinasa (z angl. multifunctional serine/threonine kinase 1)

N ..... asparagin

NES ..... nukleární exportní signál

NLS ..... nukleární lokalizační signál

NMR ..... nukleární magnetická rezonance

NOE ..... nukleární Overhauserův efekt

NOESY ..... spektroskopie nukleárního Overhauserova efektu (z angl. nuclear Overhauser effect spectroscopy)

P ..... prolin

PCR ..... polymerásová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)

PI3K ..... fosfatidylinositol-3-kinasa (z angl. phosphatidylinositol-3 kinase)

PKB ..... proteinkinasa B

PMSF ..... fenylmethylsulfonyl fluorid (z angl. phenylmethylsulphonyl fluoride)

Q ..... glutamin

R ..... arginin

Redac ..... (z angl. redundant dihedral angle constraints)

RNA ..... ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)

ROS ..... volné kyslíkové radikály (z angl. reactive oxygen species)

S ..... serin

S1–S3 ..... β-list 1–3 DNA-vazebné domény forkhead proteinů

SDS-PAGE ..... elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (z angl. sodiumdodecylsulphate polyacryleamide gel electrophoresis)

SGK ..... sérum a glukokortikoid-regulovaná proteinkinasa

STD ..... rozdíl přenesené saturace (z angl. saturation transfer difference)

T ..... thymin

TAD ..... transaktivační doména

TALOS ..... nástroj pro určení dihedrálních úhlů proteinové páteře na základě chemických posunů (z angl. Torsion Angle Likeliness Obtained from Shift and Sequence Similarity)

TBE ..... Tris/borát/EDTA pufr

TCEP ..... tris(2-karboxyethyl)fosfin

TEMED ..... tetramethylethylendiamin

Tris ..... tris(hydroxymethyl)aminomethan

Tris-HCl..... Tris hydrochlorid

V ..... valin

W ..... tryptofan

W1–W2 ..... smyčky DNA-vazebné domény forkhead proteinů

Y ..... tyrosin

YASARA ..... program pro molekulovou dynamiku (z angl. yet another scientific artificial reality application)

1 Úvod

FOXO1 a FOXO3 transkripční faktory tvoří spolu s FOXO4 a FOXO6 FOXO podrodinu forkhead transkripčních faktorů. Transkripční faktory jsou proteiny, které se váží na specifické sekvence DNA (rozpoznávací motivy) a regulují proces genové exprese na úrovni transkripce [1].

Forkhead proteiny byly poprvé objeveny u embrya *Drosophila melanogaster*, kde hrají klíčovou roli ve vývoji terminálních struktur. Mutace forkhead genu se zde projevuje charakteristickým tvarem hlavové části embrya, který připomíná vidličku, odsud pochází pojmenování forkhead (z angl. fork) [2]. Do forkhead rodiny transkripčních faktorů patří více než 100 proteinů rozdělených do podrodin FOXA–FOXR na základě podobnosti aminokyselinové sekvence. Forkhead proteiny se vyznačují svou vysoce evolučně konzervovanou DNA-vazebnou doménou (zkráceně DBD, z angl. DNA-binding domain, residua 156–269), která obsahuje helix-smyčka-helix DNA-vazebný motiv. Je tvořena třemi α-helixy, třemi β-listy a dvěma smyčkami, které svým tvarem připomínají motýlí křídla. Díky svému strukturnímu motivu bývá DBD forkhead proteinů označována za "winged-helix" DBD (v překladu okřídlený helix) [1].

Existují 4 lidské geny kódující FOXO proteiny, FOXO1, FOXO3, FOXO4 a FOXO6. DBD FOXO proteinů rozpoznává specificky sekvenční motiv 5′-(A/C)AA(C/T)A-3′. Vazbou na tento motiv regulují FOXO proteiny řadu buněčných procesů včetně apoptózy, buněčné proliferace, diferenciace, metabolismus, odpovědi na oxidativní stres a stárnutí [1].

FOXO transkripční faktory díky své schopnosti indukovat buněčnou smrt a zastavit buněčný cyklus působí jako tumorové supresory. V mnoha případech se však ukázalo, že zvýšená aktivita FOXO proteinů souvisí s různými typy rakovinného bujení. V případě neuroblastomu působí FOXO3 jako regulátor buněčné homeostáze, zvyšuje odolnost nádoru vůči chemoterapii a urychluje jeho růst. Vysoký podíl FOXO3 v jádře je spojován s pokročilým stádiem tohoto typu rakovinného bujení [3].

2 Literární přehled

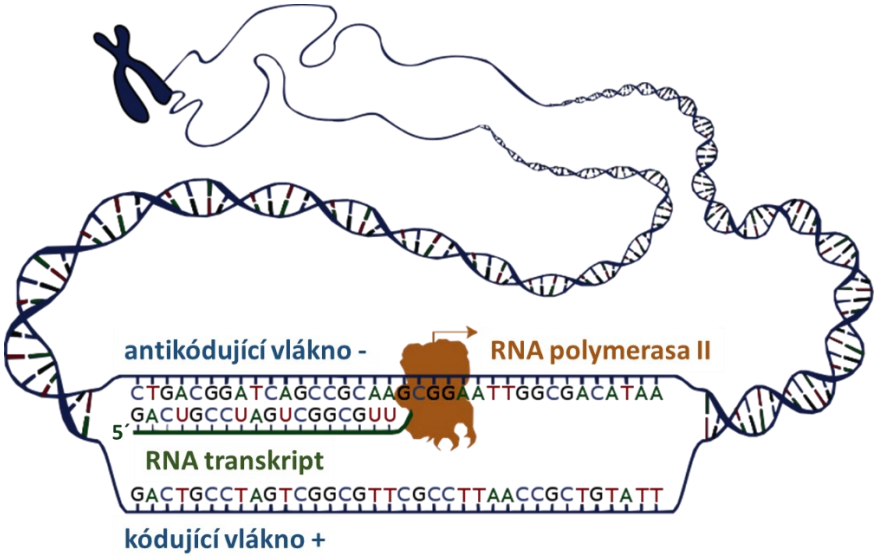
2.1 Transkripce

Transkripce je proces přepisu genetické informace uložené v sekvenci DNA do sekvence RNA pomocí DNA dependentní RNA polymerasy. Výsledkem je molekula RNA nazývaná primární transkript, která je následně posttranskripčně upravována. V případě, že gen kóduje protein, je výsledným produktem těchto úprav mediátorová RNA (mRNA), která následně slouží jako předloha pro syntézu proteinů na ribosomech. Transkripce je tak prvním krokem genové exprese, jejíž proces vystihuje schéma na obr. 2.1 [4].

Obr. 2.1 Schéma genové exprese.

Molekulu RNA nesoucí informaci o aminokyselinové sekvenci proteinu syntetizuje RNA polymerasa II, která pro svou funkci vyžaduje přítomnost transkripčních faktorů, proteinů vážících se na specifické sekvence DNA. Proces transkripce se skládá ze tří kroků, iniciace, elongace a terminace [4]. Při iniciaci transkripce se RNA polymerasa II spolu s transkripčními faktory váže na DNA sekvenci zvanou promotor a tvoří tak transkripční iniciační komplex. Během elongace čte RNA polymerasa II antikódující vlákno DNA a na základě komplementarity párů bází syntetizuje molekulu RNA vždy ve směru od 5´ do 3´ konce, viz obr. 2.2, str. 16. Elongace pokračuje, dokud RNA polymerasa II nedosáhne tzv. terminační sekvence. Dochází k disociaci RNA polymerasy II a uvolnění primárního transkriptu RNA, který následně podléhá řadě posttranskripčních úprav, finálním produktem je mRNA [4].

Transkripce je pro buňku klíčovým procesem, a je proto přísně regulována, viz kapitola 2.1.1, str.16. Regulace transkripce je zprostředkována transkripčními faktory [4].



Obr. 2.2 Schéma transkripce. RNA polymerasa syntetizuje molekulu RNA na základě komplementarity párů bazí ve směru od 5´ do 3´ konce. Jako předlohu využívá antikódující vlákno. Převzato a upraveno z [5].

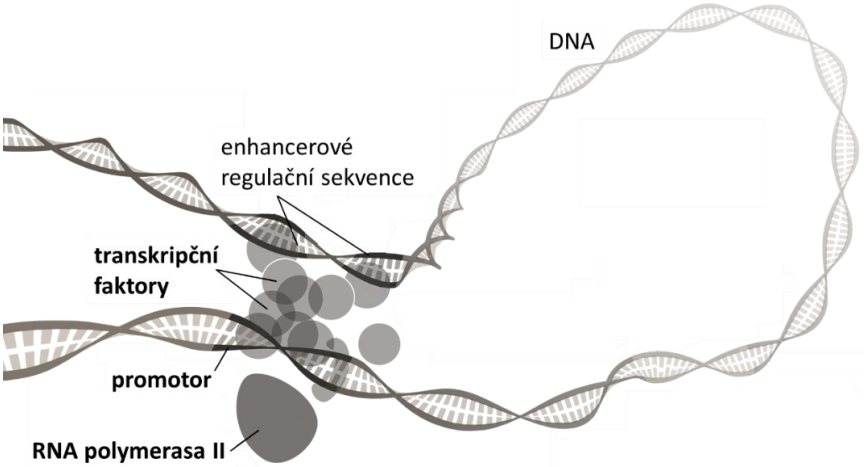
2.1.1 Regulace transkripce prostřednictvím transkripčních faktorů

Fenotyp organismu je dán kombinací genetické informace a regulací její exprese. Regulace genové exprese u eukaryotních organizmů probíhá na několika úrovních, v první řadě na úrovni transkripce. Regulace transkripce je zabezpečena transkripčními faktory, specifickými proteiny, které se váží na regulační sekvence DNA a pozitivně či negativně ovlivňují expresi cílových genů. Díky transkripčním faktorům jsou geny exprimovány ve správný čas, v příslušné tkáni a odpovídajícím množství [6].

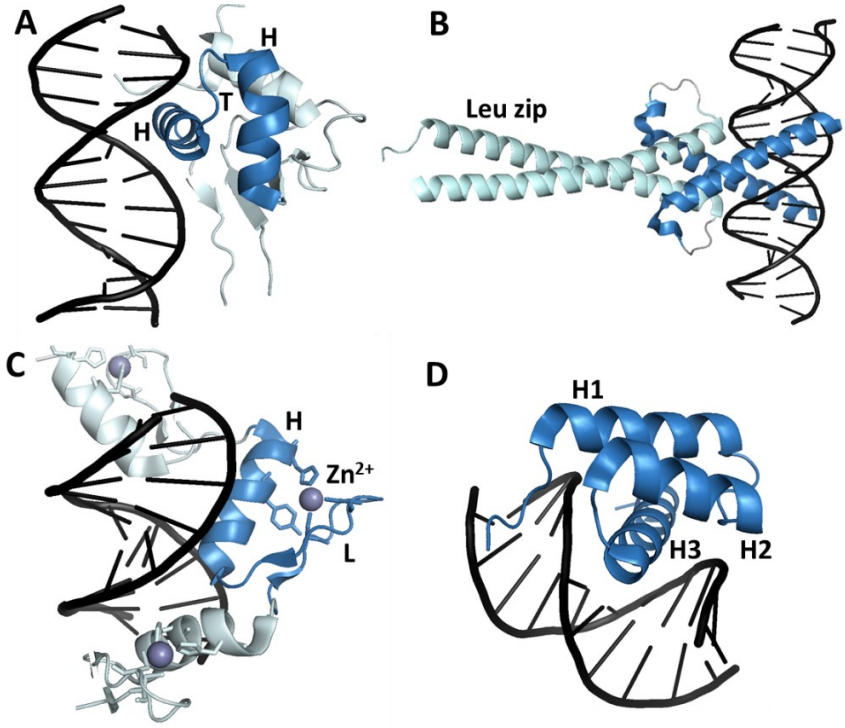
Transkripční faktory tvoří kolem 8 % lidského genomu. Jejich společným rysem je přítomnost DNA-vazebného motivu, DNA-vazebné domény, umožňující rozpoznávat regulační sekvence DNA, tvořené 6–10 páry bází [7]. Vazba transkripčních faktorů na regulační sekvence ovlivňuje funkci RNA polymerasy II pozitivně či negativně. Některé transkripční faktory se specificky váží na DNA sekvence zvané promotory, viz obr. 2.3, str. 17. DNA sekvence promotoru se nachází poblíž počátku transkripce. Vazba transkripčního faktoru na promotor napomáhá vazbě RNA polymerasy II a tvorbě transkripčního iniciačního komplexu [8].

DNA-vazebné domény, zkráceně DBD (z angl. DNA-binding domain), transkripčních faktorů jsou evolučně konzervovány a zachovávají si omezené množství strukturních motivů. Nejběžnějšími strukturními motivy jsou homeodoména (3 spojené α-helixy), "helix-turn-helix" motiv (helix-smyčka-helix), leucinový zip (dva α-helixy

vážící se na DNA jako dimer) a zinkový prst (α-helix a β-list propojené iontem Zn^{2+}) viz obr. 2.4 [9].



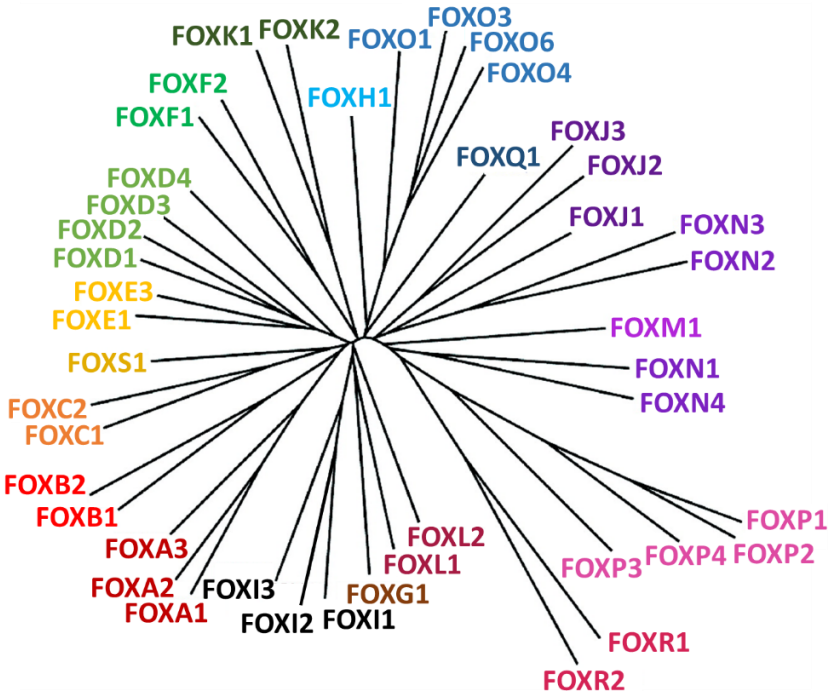
Obr. 2.3 Funkce transkripčních faktorů. Transkripční faktory se váží na regulační sekvence, vzájemně interagují a ovlivňují funkci RNA polymerasy II. Vazba transkripčních faktorů na promotor usnadňuje vazbu RNA polymerasy II a tvorbu transkripčního iniciačního komplexu. Převzato a upraveno z [10].



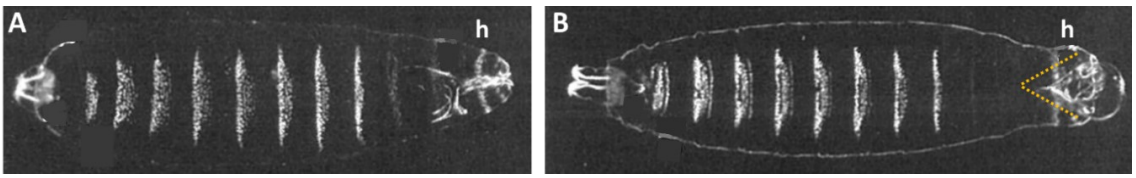
Obr. 2.4 Vybrané strukturní typy DNA-vazebných domén transkripčních faktorů. DNA vazebné strukturní motivy jsou vyznačeny tmavě modře. **A** "helix-turn-helix" DNA vazebný motiv. Krystalová struktura lidského heat-shock transkripčního faktoru I s DNA [11]. **B** Leucinový zip. Krystalová struktura heterodimeru Myc-Max s DNA. Leucinový zip je vyznačen bledě modře [12]. **C** Zinkový prst. Krystalová struktura Klf4 transkripčního faktoru s DNA [13]. **D** Homeodoména. Část krystalové struktury komplexu transkripčního faktoru Mating-type alpha-2 s DNA [14]. Obrázky byly vytvořeny v programu The PyMol Molecular Graphics System, v.0.99, Shrödinger, LLC.

2.2 FOXO transkripční faktory

FOXO transkripční faktory se řadí do forkhead rodiny transkripčních faktorů, zkracované FOX (z angl. forkhead box), charakteristické svou forkhead DBD, která je vysoce evolučně konzervována. Forkhead rodina transkripčních faktorů zahrnuje přes 100 proteinů klasifikovaných do podrodin FOXA až FOXR na základě podobnosti aminokyselinové sekvence, viz obr 2.5 [1], [15]. Pojmenování forkhead souvisí s genem pro první objevený forkhead transkripční faktor, jehož mutace způsobuje u embrya *Drosophila melanogaster* rozeklaný tvar hlavy připomínající vidličku, viz obr. 2.6 [2].



Obr. 2.5 Fylogenetický strom lidských forkhead transkripčních faktorů. Vytvořeno na základě sekvenčního srovnání v programu CLUSTALW**.** Převzato a upraveno z [16].

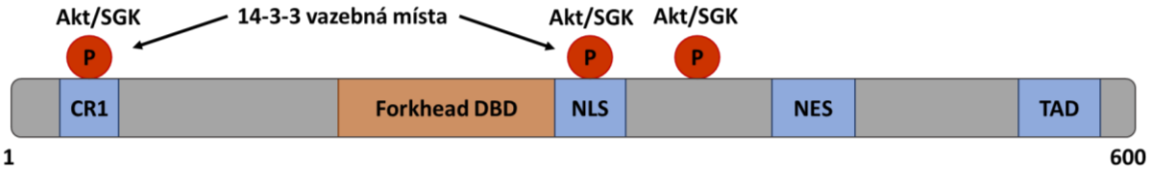


Obr. 2.6 Fenotyp embrya *Drosophila melanogaster*. A Embryo s funkčním forkhead genem. **B** Embryo s mutantním forkhead genem. Hlavová část, označena h, je špatně vyvinuta a má charakteristický tvar vidličky, vyznačeno oranžově. Převzato a upraveno z [2].

Zatímco bezobratlí mají pouze jeden FOXO gen, obratlovci mají 4 geny kódující FOXO proteiny, a to FOXO1, FOXO3, FOXO4 a FOXO6. FOXO proteiny jsou

exprimovány téměř ve všech tkáních, každý z FOXO proteinů má však unikátní motiv tkáňově specifické exprese, viz obr. 10.1 v příloze, str. 104 [17].

Primární struktura FOXO1 a FOXO3 je sekvencí cca 650 aminokyselin, FOXO4 a FOXO6 proteiny jsou sekvencí cca 500 aminokyselin. Molekuly FOXO proteinů jsou tvořeny pěti doménami: konzervovaným regionem 1 na N-konci (CR1, z angl. conserved region 1), již zmíněnou vysoce konzervovanou forkhead DBD (residua 156–269 v sekvenci FOXO3), nukleární lokalizační sekvencí (NLS), nukleární exportní sekvencí (NES) a transaktivační doménou (TAD) na C-konci, viz obr. 2.7. S výjimkou DBD je molekula FOXO proteinů tvořena nestrukturovanými oblastmi [18].



Obr. 2.7 Doménová architektura FOXO proteinů. CR1 – konzervovaný region 1 (z angl. conserved region 1), NLS – nukleární lokalizační signál, NES – nukleární exportní sekvence, TAD – transaktivační doména. Červenými kolečky jsou vyznačena fosforylační místa účastnící se hlavního regulačního mechanismu. Dvě z nich jsou zároveň vazebná místa pro regulační protein 14-3-3, viz kapitola 2.3, str. 20 [18].

Funkce FOXO transkripčních faktorů podléhá regulaci prostřednictvím insulin/PI3K/Akt signální dráhy. Aktivní FOXO transkripční faktory se nachází v jádře, kde se váží na promotory celé řady cílových genů, a tím kontrolují velké množství biologicky významných procesů. Mezi ně patří například udržení buněčné homeostáze, regulace metabolismu, apoptóza, proliferace, mechanismy opravy DNA a buněčné stárnutí [1].

2.2.1 FOXO1

FOXO1 gen byl poprvé identifikován u chromosomálních translokací nádorových buněk alveolárního rabdomyosarkomu, odtud získal svůj původní název FKHR (z angl. forkhead in rhabdomyosarcomas) [19]. Gen pro FOXO1 je lokalizován na chromosomu 13 [17]. FOXO1 je nejlépe prostudovaný transkripční faktor FOXO podrodiny transkripčních faktorů. Jeho funkce byla zkoumána na velkém množství tkání a modelů různých onemocnění. FOXO1 hraje klíčovou roli v regulaci metabolismu cukrů a tuků. Reguluje zejména ukládáná tuků do tukové tkáně a podporuje expresi glukóza-6-fosfatasy, tím

indukuje glukoneogenezi v játrech a pomáhá regulovat hladinu glukózy v krvi [20]. FOXO1 je spojován s poruchami metabolismu tuků jako je obezita a *diabetes mellitus* typu II [21]. Díky své proapoptotické funkci působí jako tumorový supresor. Jeho schopnost chránit buňky proti oxidativnímu stresu však podporuje resistenci buněk nádorů vaječníků vůči chemoterapii [22].

2.2.2 FOXO3

FOXO3 transkripční faktor byl dříve nazýván FKHLR1 (z angl. FKHR-like protein 1). Byl identifikován jako transkripční faktor příbuzný FOXO1 u chromosomálních translokací nádorových buněk akutní leukémie [23]. Gen pro FOXO3 je lokalizován na chromosomu 6 [17]. FOXO3 transkripční faktor působí proapoptoticky. Díky své schopnosti zastavit buněčný cyklus může být považován za tumorový supresor [24]. FOXO3 hraje důležitou roli při odpovědi na oxidativní stres [25]. Jeho schopnost zvyšovat odolnost vůči volným radikálům, ROS (z angl. reactive oxygen species), a chemoterapeutikům může vést k vyšší odolnosti a růstu některých typů nádorů [26]. U lidského neuroblastomu působí FOXO3 jako regulátor buněčné homeostázy, podporuje růst nádorových buněk, nádorovou angiogenezi a odolnost nádorových buněk vůči chemoterapii [3].

2.2.3 FOXO4

FOXO4 transkripční faktor byl dříve nazýván AFX (z angl. acute leukemia fusion gene located in chromosome X). Byl poprvé identifikován u chromosomálních translokací akutní leukémie jako forkhed gen lokalizovaný na chromosomu X [27]. FOXO4 hraje důležitou roli v regulaci buněčného cyklu a odpovědi na oxidativní stres. Díky své proapoptotické roli a schopnosti regulovat buněčný cyklus je považován za tumorový supresor [28]. Zvýšená hladina exprese FOXO4 je však také spojena s některými druhy rakovinného bujení [29].

2.3 Regulace funkce FOXO transkripčních faktorů

FOXO transripční faktory navázané na cílové promotory fungují jako aktivátory transkripce. Transkripční aktivita FOXO proteinů je ovlivněna posttranslačními

modifikacemi a interakcí s dalšími molekulami, jako jsou koaktivátory, korepresory a další transkripční faktory [30].

2.3.1 Regulace prostřednictvím posttranslačních modifikací

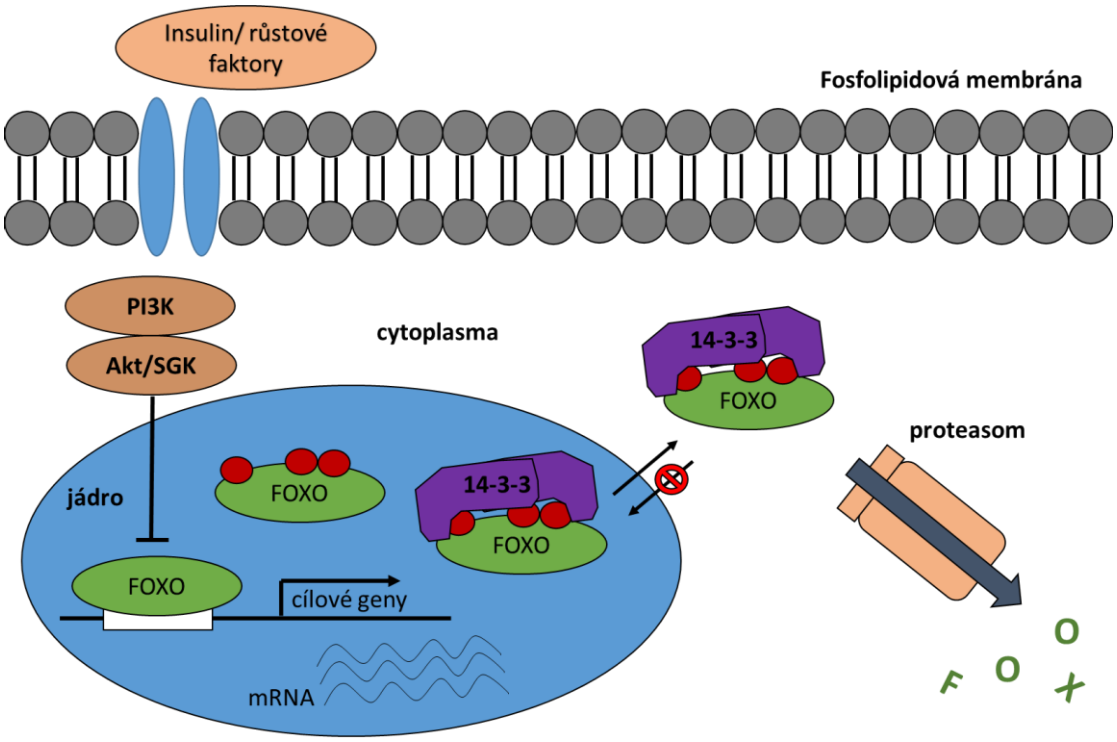
Transkripční aktivita FOXO proteinů je regulována řadou posttranslačních modifikací, které ovlivňují DNA-vazebnou afinitu, buněčnou lokalizaci, stabilitu a interakce s dalšími proteiny. Mezi nejdůležitější posttranslační modifikace patří fosforylace, acetylace a ubikvitinace regulačních míst [31].

Fosforylace: Všechny FOXO proteiny podléhají regulaci prostřednictvím insulin/PI3K/Akt signální dráhy, jejímž hlavním účinkem je kontrola buněčné lokalizace. Vazba insulinu či růstových faktorů na tyrosin kinasové receptory aktivuje fosfoinositidkinasu, PI3K, která následně aktivuje serin/threonin proteinové kinasy Akt (z angl. thymomas of AKR mice) a SGK (sérum a glukokortikoid-regulovaná proteinkinasa). Akt kinasa, též známá jako PKB (proteinkinasa B), a SGK fosforylují FOXO proteiny na třech fosforylačních místech. Jde o T32, S253 a S315 v sekvenci FOXO3 [32]. Fosforylace FOXO proteinů na prvních dvou fosforylačních místech, T32 a S253, vytvoří vazebné místo pro regulační protein 14-3-3 [33]. Vazba dimeru 14-3-3 proteinu zapříčiní export FOXO proteinů z jádra do cytoplasmy, a tím jejich deaktivaci, viz obr 2.8, str. 22. Vazbou 14-3-3 pravděpodobně dochází ke konformačním změnám, odkrytí jaderné exportní sekvence a zakrytí jaderného lokalizačního signálu, což následně brání zpětnému přechodu FOXO proteinů do jádra. Fosforylované FOXO proteiny jsou v cytoplasmě degradovány na proteasomech [34].

Hlavním úkolem Akt/SGK zprostředkované fosforylace je relokalizace FOXO transkripčních faktorů z jádra do cytoplasmy. Fosforylace prostřednictvím Akt je ale také schopna negativně ovlivnit vazbu FOXO proteinů na DNA. Fosforylace na druhém ze tří konzervovaných míst lokalizovaném v α-helixu H3, viz obr. 2.9, str. 23, který je klíčový pro vazbu DNA, přináší záporný náboj na DNA-vazebný povrch a tím inhibuje vazbu na DNA [35]. V případě FOXO4 je pro úplnou inhibici vazby na DNA nutná jeho vazba na protein 14-3-3 [36].

Oxidativní stres vede k translokaci FOXO proteinů do jádra bez ohledu na přítomnost růstových faktorů. V odpovědi na oxidativní stres fosforyluje MST1 kinasa (z angl. multifunctional serine/threonine kinase 1) FOXO3 na S207, čímž inhibuje vazbu

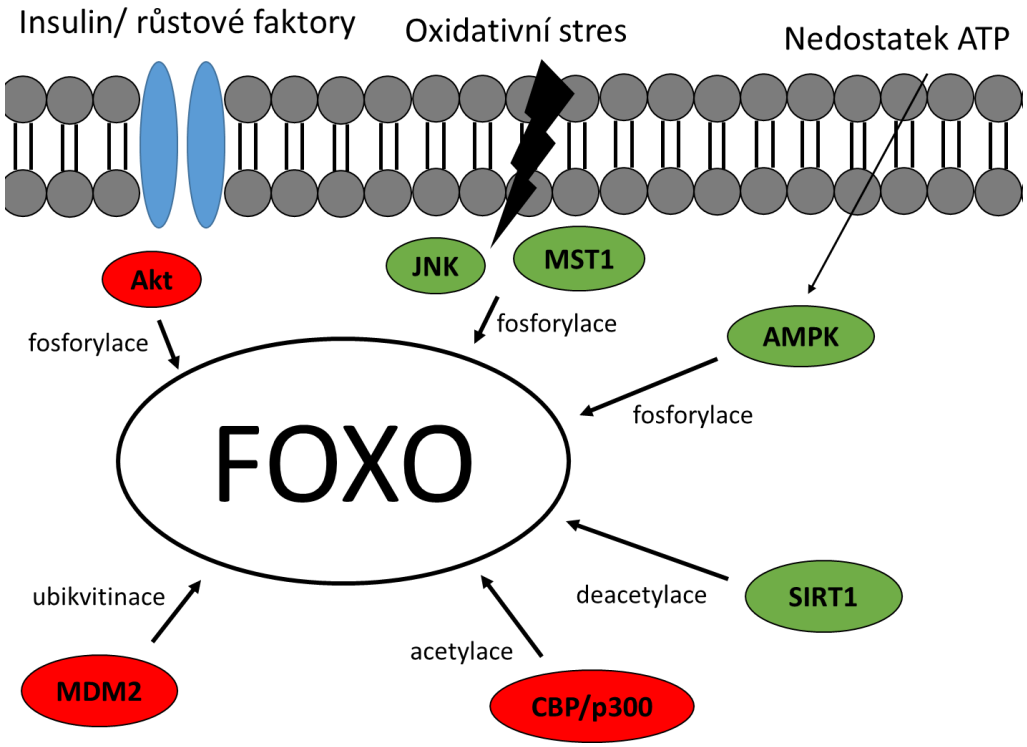
14-3-3 a umožní přechod FOXO3 zpět do jádra [37]. JNK kinasa (z angl. c-Jun N-terminal kinase) působí stejným efektem v případě FOXO4 [38]. MST1 a JNK kinasy aktivované oxidativním stresem působí proti insulinové signální dráze a aktivují FOXO transkripční faktory. AMPK (z angl. 5' AMP-activated protein kinase) fosforyluje FOXO proteiny při nedostatku ATP (adenosintrifosfát) a aktivuje jejich transkripční program [39].



Obr. 2.8 Model inhibice FOXO transkričních faktorů v odpovědi na insulin a růstové faktory. FOXO proteiny se náchází v jádře, kde se podílí na transkripci cílových genů. V přítomnosti insulinu, resp. růstových faktorů, jsou aktivovány Akt a SGK kinasy a v jádře dochází k fosforylaci FOXO proteinů. Fosforylace FOXO proteinů vede k vazbě regulačních proteinů 14-3-3 a exportu mimo jádro. Fosforylované FOXO proteiny jsou v cytoplasmě degradovány na proteasomech [24].

Acetylace: FOXO proteiny mají ve své sekvenci řadu lysinů, které podléhají acetylaci prostřednictvím acetyltransferas. Řada z nich je lokalizována uvnitř DBD nebo nukleárního lokalizačního signálu, viz obr 2.9, str. 23. Acetylace FOXO transkripčních faktorů je zprostředkována CBP (z angl. CREB-binding protein) a p300 a zpravidla působí deaktivačně [40]. Acetylace FOXO1 a FOXO3 negativně ovlivňuje jejich schopnost vázat DNA [42]. Krystalová struktura komplexu FOXO3 s DNA ukázala, že K245 přímo interaguje s fosfátovou skupinou DNA, viz obr. 2.15, str. 29, a obr. 2.9, str. 23, a jeho acetylace může tuto interakci narušit [43]. Deacetylaci FOXO transkripčních faktorů zprostředkují deacetylasy sirtuinové rodiny deacetylas [41].

Ubikvitinace: Ubikvitinace FOXO proteinů se podílí na regulaci jejich četnosti a buněčné lokalizace. FOXO proteiny podléhají jak monoubikvitinaci, tak polyubikvitinaci. Polyubikvitinace FOXO proteinů prostřednictvím MDM2 (z angl. mouse double minute 2 homolog) E3 ubikvitin ligasy indukuje jejich následnou degradaci na proteasomech. Monoubikvitinace je indukována oxidativním stresem a vede k vyššímu zastoupení FOXO3 v jádře a podporuje tak jeho transkripční aktivitu [44].



Fosforylace

Enzym	FOXO1	FOXO3	FOXO4	FOXO6	Efekt
Akt/SGK	T24 S256 S319	T32 S253 S315	T28 S193 S258	T26 S184	inhibice
MST1		S207			aktivace
JNK			T447 T451		aktivace
AMPK		T179 S399 S413 S555 S588 S626			aktivace

Acetylace

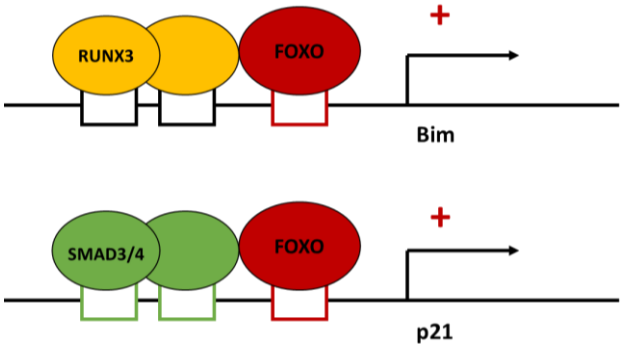
Enzym	FOXO1	FOXO3	FOXO4	FOXO6	Efekt
CBP/p300	K242 K245 K262	K242 K245 K259	K186 K189 K407	K173 K176 K190	inhibice
SIRT1	K274 K294	K271 K290	K215 K237	K271 K290	aktivace

Obr. 2.9 Posttranslační modifikace FOXO transkripčních faktorů. V horní části je schéma regulace FOXO proteinů v odpovědi na vnější stimuly. V dolní části je tabulka regulačních míst v sekvenci FOXO proteinů, která podléhají posttranslačním modifikacím. Červeně vyznačené aminokyseliny jsou součástí DBD [24].

2.3.2 Ostatní mechanismy regulace

Interakce s koaktivátory/korepresory: Funkce FOXO proteinů je často spojena s asociací s transkripčními aktivátory a represory, jako jsou histon deacetylasy, acetyltransferasy, jaderné hormony, beta-catenin, myocardin a mnoho dalších [21], [20].

Interakce s dalšími transkripčními faktory: FOXO transkripční faktory interagují s několika specifickými transkripčními faktory, které napomáhají kontrole nad expresí cílových genů. Interakce s řadou transkripčních faktorů podporuje expresi cílových genů. Jedním z příkladů je interakce FOXO s RUNX3 (z angl. RUNX family franscription factor 3) transkripčním faktorem. FOXO a RUNX3 společně indukují transkripci proapoptotického genu Bim, viz obr. 2.10 [23]. FOXO proteiny interagují se SMAD3 a SMAD4 a indukují expresi inhibitoru buněčného cyklu p21, viz obr. 2.10 [24].

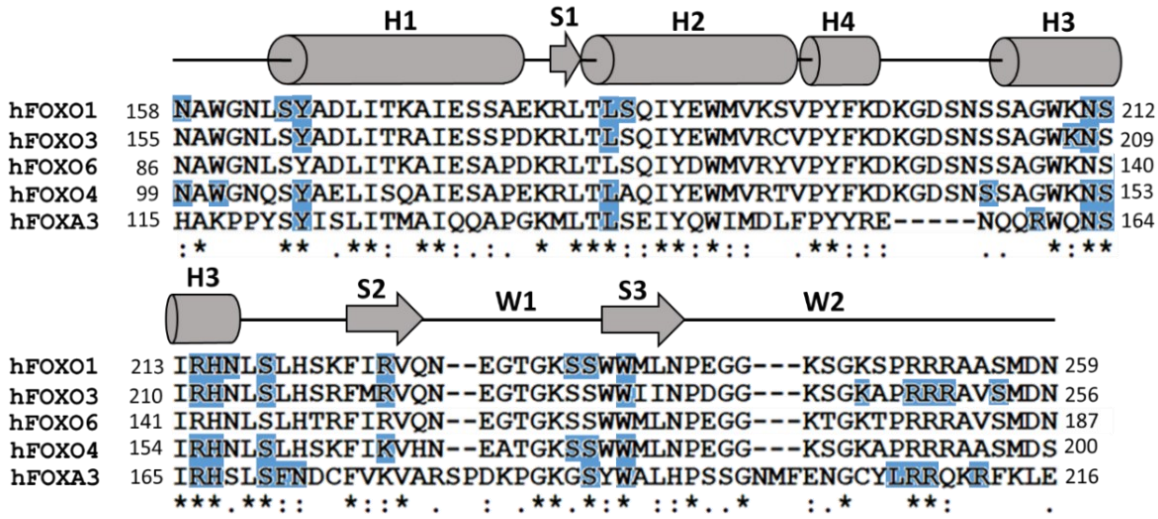


Obr. 2.10 Regulace FOXO transkripční aktivity interakcí s dalšími transkripčními faktory. Interakce s RUNX3 vede k transkripci proapoptotického genu Bim, interakce se SMAD3 nebo 4 vede k transkripci inhibitoru buněčného cyklu p21. Promotory genu pro Bim a p21 mají jedno vazebné místo pro FOXO proteiny a dvě pro kooperující transkripční faktor [23], [24].

Regulace prostřednictvím miRNA: Četnost FOXO proteinů v buňce je regulována i prostřednictvím microRNA (miRNA). miRNA jsou jednovláknové řetězce RNA o délce 21-23 nukleotidů, vznikající přepisem genů v DNA, které následně nejsou přeloženy do aminokyselinové sekvence proteinu. Molekuly miRNA jsou částečně komplementární k určitým mRNA a jsou schopny negativně regulovat jejich translaci [45]. Exprese FOXO proteinů je posttranslačně regulována prostřednictvím řady miRNA. miR-27a, miR-96 a miR-182 snižují úroveň exprese FOXO1 v buňkách nádoru prsu [45], četnost metastáz melanomu souvisí s inhibicí FOXO3 exprese prostřednictvím miR-182 [46].

2.4 Struktura DBD FOXO proteinů

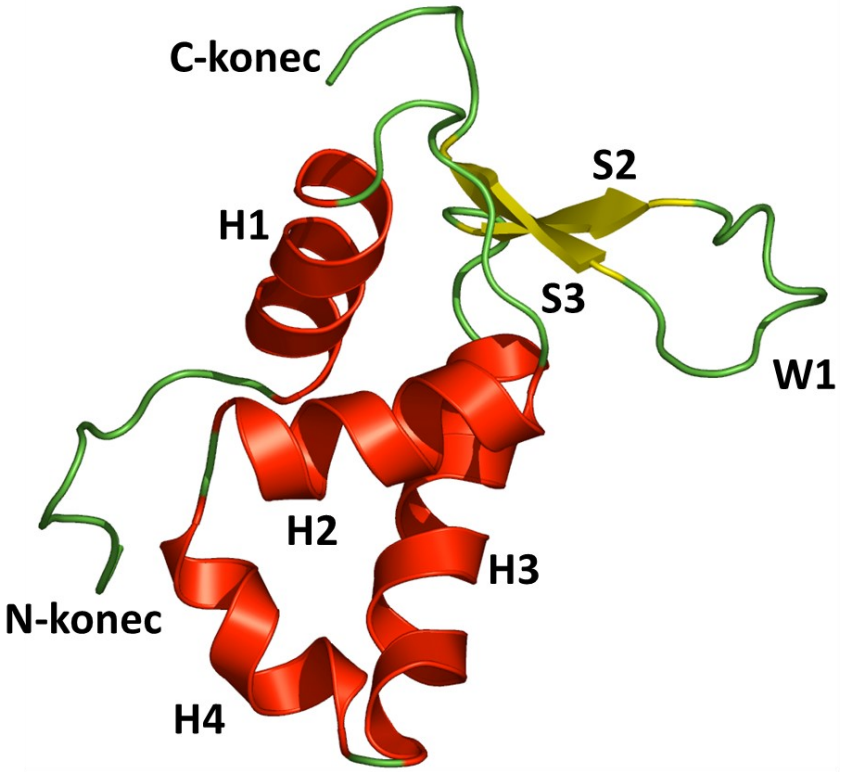
Forkhead transkripční faktory se vyznačují vysoce konzervovanou DBD, kterou tvoří sekvence cca 110 aminokyselin. Díky svému strukturnímu motivu je označována jako "winged-helix" DBD, v překladu okřídlený helix [47]. DBD FOXO transkripčních faktorů je kompaktní a tvoří ji tři α-helixy, H1, H2 a H3, tři vzájemně interagující antiparalelní β-listy, S1, S2 a S3, a dvě smyčky W1 a W2 (angl. wings), viz obr. 2.12, str. 26. Uspořádání elementů sekundární struktury je H1-S1-H2-H3-S2-W1-S3-W2 [30]. FOXO transkripční faktory mají mezi α-helixy H2 a H3 5 aminokyselin navíc (KGDSN) oproti ostatním forkhead transkripčním faktorům. Řada forkhead transkripčních faktorů má mezi α-helixy H2 a H3 vložen krátký 3_{10}-helix H4 [48]. α-helix H3 je klíčový pro specifickou vazbu na DNA. Vazby na DNA se dále účastní W1 smyčka, oblast mezi helixy H3 a H4 a C-konec [49]. Drobné rozdíly v aminokyselinové sekvenci, viz obr. 2.11, se odráží ve strukturních rozdílech DBD FOXO transkripčních faktorů a souvisí s jejich odlišnou funkcí. Znalost struktury volné DBD i jejího komplexu s DNA umožňuje vývoj selektivních inhibitorů, což je náplní této práce.



Obr. 2.11 Sekvenční srovnání DBD FOXO transkripčních faktorů. Porovnání se sekvencí lidského FOXA3 ukazuje vysoký stupeň konzervovanosti DBD forkhead transkripčních faktorů. Sekvenční alignment byl proveden pomocí programu CLUSTALW. * je symbolem pro shodné aminokyseliny, : značí strukturně podobné aminokyseliny, . značí strukturně méně podobné aminokyseliny. Modře jsou vyznačeny aminokyseliny účastnící se interakce s DNA. Nad sekvenčním alignmentem je graficky znázorněna sekundární struktura, válec značí α-helixy, šipky β-listy.

V současné době je známa struktura komplexu DBD s DNA pro FOXO1 [50], FOXO3 [43] a FOXO4 [51], všechny struktury komplexu s DNA byly řešeny pomocí

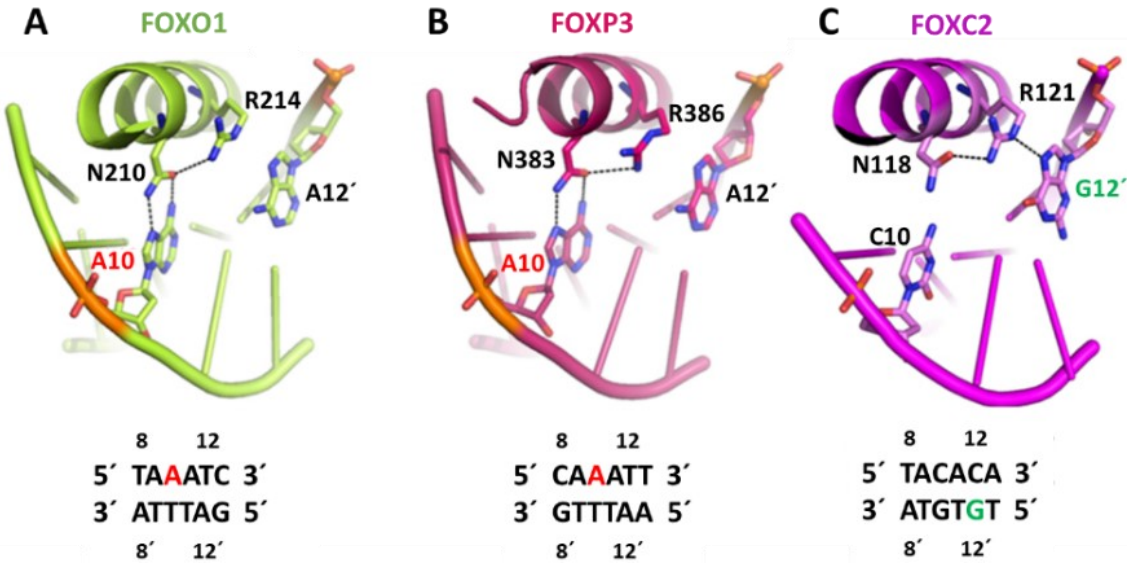
rentgenové strukturní analýzy, viz obr. 2.14, str. 28. Struktury volné DBD řešené pomocí NMR jsou známy pro FOXO3 [52], viz obr. 2.12, a FOXO4 [53]. V této práci je řešena struktura DBD FOXO1 [54].



Obr. 2.12 Struktura volné DBD FOXO3. Na obrázku jsou odlišnými barvami vyznačeny elementy sekundární struktury DBD FOXO3. Helixy H1–H4 jsou vyznačeny červeně, β-listy jsou vyznačeny žlutě [52]. Obrázek byl vytvořen v programu The PyMol Molecular Graphics System, v.0.99, Shrödinger, LLC.

2.5 Vazba DBD FOXO proteinů na DNA

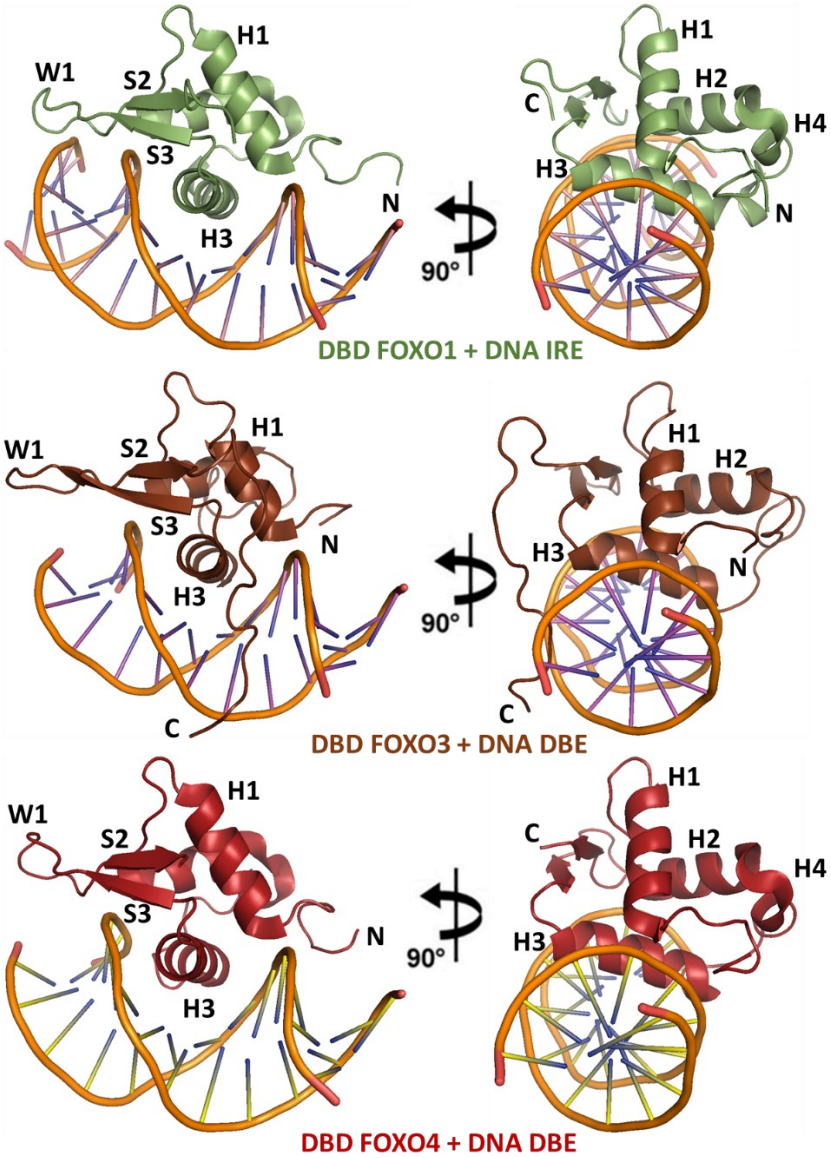
Struktury komplexu DBD forkhead transkripčních faktorů s DNA s vysokým rozlišením umožňují nahlédnout mechanismu rozpoznávání a vazby na DNA. Krystalová struktura komplexu FOXA3 s DNA byla první z nich [55]. Všechny forkhead transkripční faktory rozpoznávají sekvenci 5′-(A/C)AA(C/T)A-3′ [56], jejich DBD interagují s molekulou DNA jako monomer. Tvorba komplexu je zprostředkována kombinací specifických interakcí s nukleovými bázemi DNA a nespecifických interakcí s její cukr-fosfátovou kostrou. Aminokyseliny účastnící se specifických interakcí s nukleovými bázemi DNA, zejména aminokyseliny α-helixu H3, jsou konzervovány v celé forkhead rodině transkripčních faktorů, viz obr 2.13, str. 27, a 2.11, str. 25 [49].



Obr. 2.13 Interakce forkhead transkripčních faktorů s DNA. Detail krystalových struktur znázorňující vazbu α-helixu H3 do velkého žlábku DNA. Aminokyseliny H3 jsou konzervovány u všech forkhead transkripčních faktorů, viz obr. 2.11, str. 25. V DNA sekvenci jsou červeně vyznačeny specifické interakce. **A** Komplex FOXO1 s DNA [57]. **B** Komplex FOXP3 s DNA [58]. **C** Komplex FOXC2 s DNA [59]. Převzato a upraveno z [59].

FOXO transkripční faktory specificky váží sekvenci 5′-GTAAA(T/C)AA-3′, známou jako DBE (z angl. daf-16 family binding element), a s o něco nižší afinitou sekvenci 5′-(C/A)(A/C)AAA(C/T)AA-3′, známou jako IRE (z angl. insuline-responsive element) [60]. Disociační konstanty pro oba motivy jsou v řádu desítek nanomolární [61].

α-helix H3 se váže do velkého žlábku kolmo na osu molekuly DNA a tvoří hlavní část DNA-vazebného povrchu. Jeho motiv N–X–X–R–H–X–X–S/T je klíčový pro specifickou vazbu na DNA, viz obr. 2.13. Komplex protein-DNA je dále stabilizován nespecifickými interakcemi s cukr-fosfátovou kostrou DNA, kterých se účastní W1 smyčka, některá residua α-helixů H1 a H2, β-listu S3 a C-konce, viz. obr. 2.14, str. 28, a 2.11, str. 25 [49].

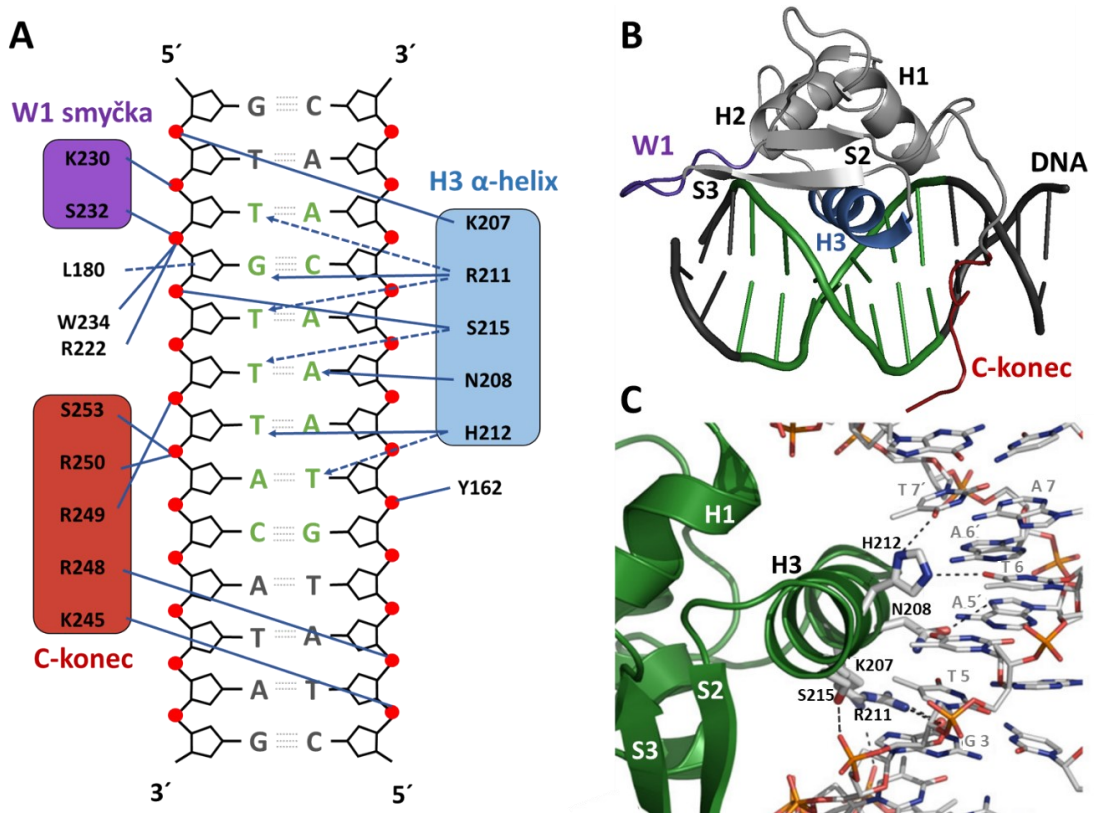


Obr. 2.14 Krystalové struktury komplexu DBD FOXO transkripčních faktorů s DNA. Zeleně komplex DBD FOXO1 s DNA s IRE motivem [50]. Hnědě komplex DBD FOXO3 s DNA s DBE motivem [43]. Červeně komplex DBD FOXO4 s DNA s motivem DBE [51]. Obrázky byly vytvořeny v programu The PyMol Molecular Graphics System, v.0.99, Shrödinger, LLC.

2.5.1 Interakce DBD FOXO3 s DNA

Struktura DBD FOXO3 a DBE sekvence DNA s rozlišením 2,7 Å jako první poskytla popis interakce FOXO proteinů s DNA [43]. Konzervovaná residua α-helixu H3 interagují s nukleovými bázemi DBE sekvence specificky prostřednictvím vodíkových můstků a Van der Waalsových interakcí. Těchto interakcí se účastní zejména N208, R211, H212 a S215, viz obr. 2.15, str. 29. Van der Waalsovy interakce mezi methylovými skupinami thyminů a postranními řetězci α-helixu H3 jsou klíčové pro specifické rozpoznání DBE sekvence [62].

Residua W1 smyčky přispívají ke stabilitě protein-DNA komplexu interakcí s fosfátovými skupinami cukr-fosfátové kostry DNA, nijak však nepřispívají ke specifitě vazby na DNA. C-konec v komplexu s DNA zaujímá šroubovicovou strukturu a jeho bazická residua R248, R249 a R250 interagují s fosfátovými skupinami elektrostaticky [43].



Obr. 2.15 Interakce FOXO3 s DNA. A Schematické znázornění interakcí FOXO3 s DNA. Fosfátové skupiny jsou zakresleny jako červená kolečka, páry bází DBE sekvence jsou zvýrazněny zeleně. Šipkami jsou vyznačeny specifické interakce s bázemi DNA, plnou čarou vodíkové můstky, přerušovaně Van der Waalsovy interakce. Čarou jsou znázorněny nespecifické interakce s cukr-fosfátovou kostrou DNA, plnou čarou iontové můstky a vodíkové můstky, přerušovaně Van der Waalsovy interakce. **B** Krystalová struktura DBD FOXO3 s DNA [43]. Barevné vyznačení odpovídá A. Obrázek byl vytvořen v programu The PyMol Molecular Graphics System, v.0.99, Shrödinger, LLC.**C** Detail specifických interakcí DBD FOXO3 s DNA. Převzato a upraveno z [62].

2.6 Selektivní inhibice transkripčních faktorů

Řada nádorových onemocnění je spjata s poruchami v regulaci činnosti transkripčních faktorů. Kolem 20 % transkripčních faktorů je onkogenních a jejich zvýšená aktivita provází procesy rakovinného bujení, což činí transkripční faktory předmětem vývoje medikamentů pro léčbu rakoviny. Jednou ze strategií regulace genové exprese při léčbě rakoviny je nepřímé ovlivnění aktivity transkripčních faktorů prostřednictvím

inhibice regulačních proteinů, zejména kinas. Inhibice kinas však zpravidla vede k zablokování více signálních drah a často neovlivní ativitu pouze jednoho transkripčního faktoru. Je tedy žádoucí inhibovat aktivitu konkrétního transkripčního faktoru přímo [63].

Narozdíl od snadno realizovatelné inhibice enzymů je přímá selektivní inhibice aktivity transkripčních faktorů pomocí nízkomolekulárních látek nelehkým úkolem. Transkripční faktory totiž postrádají "vazebnou kapsu" vhodnou pro navázání ligandu. V mnoha případech je jediným známým vazebným partnerem molekula DNA. DNA-vazebný povrch bývá rozsáhlý a transkripční faktory při vazbě na cílovou DNA často prochází konformačními změnami. Znalost struktury komplexu transkripčního faktoru s DNA, jeho dynamiky a klíčových interakcí umožnuje vývoj přímých selektivních inhibitorů DNA-vazebné aktivity transkripčních faktorů [64].

2.6.1 Strategie přímé inhibice

Nízkomolekulární sloučeniny, které jsou schopné vázat se na DBD transkripčních faktorů, blokují vazbu na DNA, případně indukují konformační změny. Tyto inhibitory jsou zpravidla výsledkem *in silico* prohledávání rozsáhlých knihoven sloučenin a robustních biochemických metod (např. měření anizotropie fluorescence) [64].

Transkripce genů je komplexní proces a při jeho regulaci hrají roli protein-DNA interakce, protein-protein interakce a remodelace chromatinu. Proto existuje více strategií přímé inhibice aktivity transkripčních faktorů. Řada transkripčních faktorů je aktivní ve formě homo nebo heterodimeru nebo vyžadují přítomnost kofaktorů. Další strategie přímé inhibice je tak založena na inhibici protein-proteinové interakce. Dnes široce využívaná strategie inhibice aktivity transkripčních faktorů je zaměřena na remodelaci chromatinu. Inhibice proteinů, které specificky rozpoznávají acetylované lysiny histonových proteinů, vede k znepřístupnění DNA a překvapivě selektivní inhibici jinak těžko regulovatelných transkripčních faktorů [64].

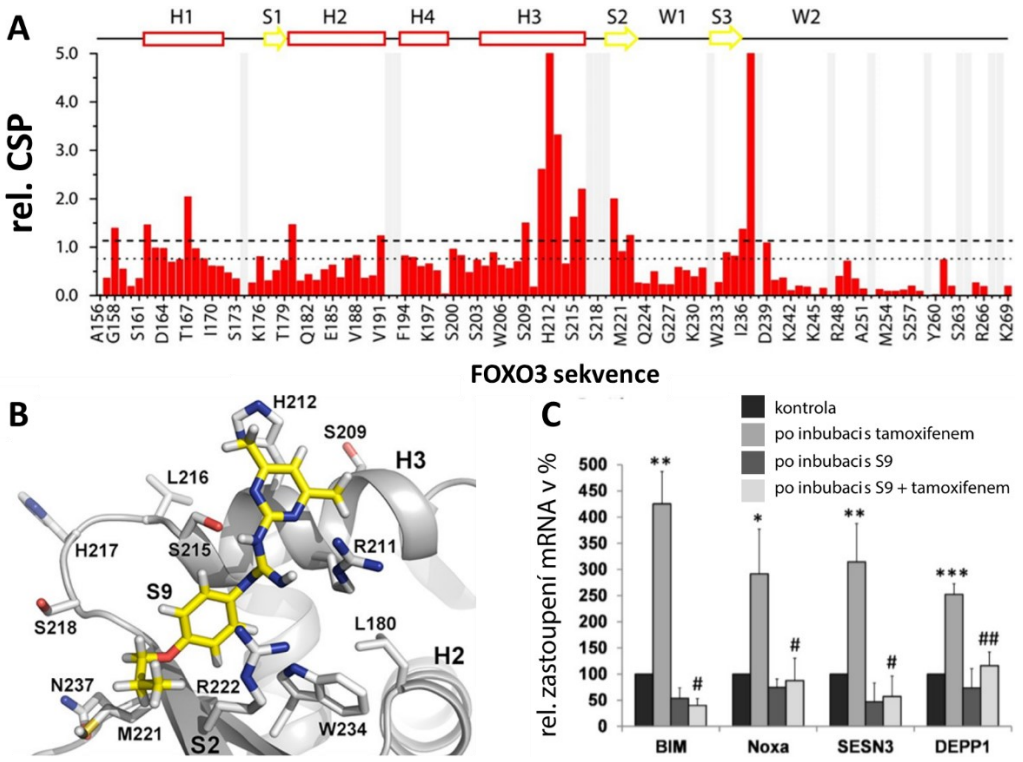
2.6.2 Inhibice forkhead transkripčních faktorů

Přestože přímá inhibice aktivity transkripčních faktorů je nelehkým úkolem, existuje několik nízkomolekulárních inhibitorů schopných inhibovat aktivitu forkhead transkripčních faktorů *in vivo* nebo v tkáňových kulturách.

Inhibice FOXM1: FOXM1 transkripční faktor, spadající do forkhead rodiny transkripčních faktorů, hraje klíčovou roli při vývoji plodu. Je však také zodpovědný za rezistenci nádorových buněk vůči látkám používaným při chemoterapii. Práce Hedge *et al.* identifikuje thiostreption, přírodní antibiotikum streptomycet, jako inhibitor FOXM1, vážící se na DBD, viz tab. 2.1, str. 32. Thiostrepton inhibuje interakci FOXM1-DNA s IC_{50} v řádu desítek mikromolární [65]. Prohledání velké knihovny sloučenin pomohlo Gormally *et al.* identifikovat další inhibitory FOXM1, které indukují buněčnou smrt nádorových buněk rakoviny prsu [66]. V této práci bylo identifikováno 16 inhibitorů značených FDI-1–FDI-16. Inhibitor FDI-6, viz tab 2.1, str. 32, je komerčně dostupný.

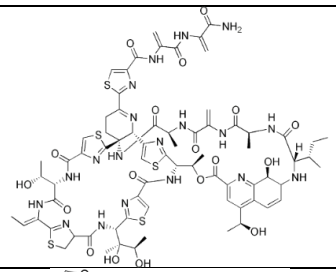
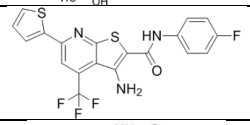
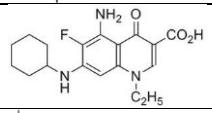
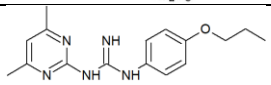
Inhibice FOXO1: Transkripční faktor FOXO1 hraje klíčovou roli v metabolismu a tvorbě tukové tkáně. V práci Nagashima *et al.* byl pomocí hmotnostní spektrometrie identifikován potenciální inhibitor AS1842856, viz tab 2.1, str. 32, vážící se na FOXO1. AS1842856 efektivně snížil aktivitu FOXO1 HepG2 buněk s IC_{50} = 33nM a redukoval produkci glukózy v játrech myší s *diabetem* typu II [67]. Navazující studie ukázaly, že inhibitor FOXO1 AS1842856 pomáhá zastavit tvorbu tukové tkáně [68]. Inhibitor FOXO1 tak může být potenciálně využit i při léčbě obezity.

Inhibice FOXO3: FOXO3 transkripční faktor je díky své schopnosti indukovat buněčnou smrt a regulovat buněčný cyklus považován za tumorový supresor. Nicméně u některých druhů rakovinného bujení napomáhá růstu nádoru a pomáhá udržovat jeho rezistenci vůči chemoterapeutickým látkám. Na základě znalosti struktury komplexu DBD FOXO3 s DNA [43] a prohledání knihoven nízkomolekulárních látek bylo v předchozí studii, kterou provedlo oddělení Pediatrie I a II, Medizinische Universität Innsbruck ve spolupráci s naší výukumnou skupinou, identifikováno 76 potenciálních inhibitorů FOXO3. Pomocí měření anisotropie fluorescence byla k dalším experimentům vybrána sloučenina S9, která nejefektivněji inhibovala vazbu FOXO3 na DNA. Výsledky nedávno publikované práce ukázaly, že sloučenina S9 interaguje s DBD FOXO3 v oblasti α-helixu H3, viz obr. 2.16, str. 32, který je klíčový pro vazbu DNA. Tímto sloučenina S9 blokuje DNA-vazebný povrch FOXO3. Experimenty na tkáňových kulturách zároveň ukázaly, že sloučenina S9 negativně ovlivňuje transkripci cílových genů FOXO3 [69]. Část těchto výsledků je shrnuta v bakalářské práci "Studium interakcí nízkomolekulárních látek s DNA-vazebnou doménou forkhead transkripčního faktoru FOXO3" [70].



Obr. 2.16 Shrnutí výsledků předchozí studie. **A** Graf změn chemických posunů, CSP, jednotlivých aminokyselin DBD FOXO3. Tučná přerušovaná čára značí mez signifikance. Z grafu je patrné, že sloučenina S9 se váže hlavně do oblasti α-helixu H3, klíčového pro vazbu na DNA. **B** Reprezentativní konformace komplexu FOXO3 a sloučeniny S9 získaná na základě molekulového dokování. **C** Graf znázorňující relativní vazbu FOXO3 na promotory cílových genů měřenou pomocí kvantitativní PCR. Buňky neuroblastomu (linie SH-EP) byly po tři hodiny inkubovány s přídavky 100nM tamoxifenu a 50μM S9. Z grafu je zřejmé, že sloučenina S9 deaktivuje FOXO3 transkripční program. Pozn.: 4-hydroxytamoxifen indukuje expresi FOXO3. Převzato a upraveno z [69].

Tab. 2.1 Inhibitory transkripční aktivity forkhead transkripčních faktorů

Inhibitor	Vzorec	název	K_d	IC_{50}*
FOXM1		thiostrepton	9.8 ± 1.1 μm	42.6 ± 1.4 μm
FOXM1		FDI-6	-	22.5±12.3 μM
FOXO1		AS1842856	-	33nM
FOXO3		S9	-	-

*Inhibiční konstanta IC_{50} byla v případě FOXM1 inhibitorů stanovena na základě *in vitro* experimentů [66], v případě FOXO1 je výsledkem experimentu na tkáňových kulturách. [67]

3 Cíle práce

1. Exprese a purifikace neznačené a ^{15}N značené DBD FOXO3.
2. Exprese a purifikace ^{13}C a ^{15}N značené DBD FOXO1.
3. Rezonanční přiřazení NMR spekter ^{13}C a ^{15}N značené DBD FOXO1 pro vyřešení struktury pomocí NMR.
4. Ověření schopnosti nově syntetizovaných sloučenin inhibovat vazbu FOXO3 DBD na DNA pomocí nativní elektroforézy.
5. Charakterizace interakce vybraných inhibitorů s DBD FOXO3 pomocí ^{1}H-^{15}N HSQC αexperimentů, ^{1}H STD experimentů a molekulového dokování.

4 Materiál

4.1. Seznam chemikálií

1,4-dithiothreitol	Carl Roth Gmbh & Co. Kg (Německo)
^{15}N značený chlorid amonný	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
^{13}C značená glukóza	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
ampicilin	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
azid sodný	PENTA (Česká republika)
bromfenolová modř	Carl Roth Gmbh & Co. Kg (Německo)
CBB G-250	Carl Roth Gmbh & Co. Kg (Německo)
D-biotin	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
D-glukóza	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
dihydrogenfosforečnan sodný (dihydrát)	PENTA (Česká republika)
dimethylsulfoxid	Carl Roth Gmbh & Co. Kg (Německo)
dodecylsíran sodný	Carl Roth Gmbh & Co. Kg (Německo)
EDTA	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
glycerol	Carl Roth Gmbh & Co. Kg (Německo)
hydrogenfosforečnan sodný (dodekahydrát)	PENTA (Česká republika)
hydroxid sodný	PENTA (Česká republika)
chlorid draselný	PENTA (Česká republika)
chlorid hořečnatý (hexahydrát)	LACH-NER, s.r.o. (Česká republika)
chlorid kobaltnatý (hexahydrát)	PENTA (Česká republika)
chlorid manganatý (tetrahydrát)	PENTA (Česká republika)
chlorid měďnatý (dihydrát)	PENTA (Česká republika)
chlorid sodný	PENTA (Česká republika)
chlorid vápenatý	PENTA (Česká republika)
chlorid zinečnatý	PENTA (Česká republika)
chlorid železitý (hexahydrát)	PENTA (Česká republika)
IPTG	EMD Biosciences, Inc. (Německo)
isopropanol	PENTA (Česká republika)

kalibrační pufry (pH = 4,01; 7,01; 10,00)	Hanna Instruments Czech s.r.o. (Česká republika)
kvasinkový extrakt	SERVA Electrophoresis Gmbh (Německo)
kyselina boritá	PENTA (Česká republika)
lysozym	SERVA Electrophoresis Gmbh (Německo)
PMSF	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
PreScission proteasa	připravena Mgr. L. Malou a M. Kolcunovou
redukovaný glutathion	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
Rotiphorese gel	Carl Roth Gmbh & Co. Kg (Německo)
SIGMA*FAST*™ inhibitory proteáz	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
síran hořečnatý (heptahydrát)	PENTA (Česká republika)
síran sodný (dekahydrát)	PENTA (Česká republika)
thiamin	Carl Roth Gmbh & Co. Kg (Německo)
TCEP	Thermo Fisher Scientific, Inc. (USA)
těžká voda	Euriso-top Gmbh (Německo)
TRIS	Carl Roth Gmbh & Co. Kg (Německo)

4.2 Použité přístroje

ÄKTAprime	GE Healthcare (USA)
analytické váhy ABS 120-4	KERN & SOHN (Německo)
centrifuga 5804R	Eppendorf AG (Německo)
centrifuga Universal 4 x 100 Z323K	HERMLE Labortechnik GmbH (Německo)
centrifuga 5415D	Eppendorf AG (Německo)
centrifuga MiniSpin PL-109	Eppendorf AG (Německo)
FUSION Solo S	Vilber Lourmat (Francie)
orbital shaker PSU-10i	P-LAB (Česko)
NMR spektrometr Avance III	Bruker (USA)
pH-metr JENWAY 3505	P-LAB (Česko)
peristaltická pumpa	IDEX Health & Science (Švýcarsko)

předvážky EG-420 NM	KERN & SOHN (Německo)
Shaking inkubátor NB-205	N-BIOTEK, Inc. (Korejská republika)
spektrofotometr IMPLEN P300	BioTech (USA)
spektrofotometr NanoDrop	Thermo Fisher Scientific, Inc. (USA)
spektrofotometr UV-1800 s Peltierovým termostatem S-1700	Shimadzu Corporation (Japonsko)
stroj na výrobu ledu	Brema Ice Makers (Itálie)
suchý ohřívač	Grant Instruments (Velká Británie)
vortex ZX3	VELP Scientifica (Itálie)
zdroj pro vertikální elektroforézu	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)

4.3 Ostatní pomůcky

5mm kyvety	NORELL, Inc. (USA)
aparatura pro vertikální elektroforézu	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)
automatické pipety	Eppendorf AG (Německo)
dialyzační membrána Spectra/Por	SERVA Electrophoresis Gmbh (Německo)
E.coli BL21(DE3)	Stratagene Corporation (USA)
filtry o velikosti pórů 0,45 μm	GE Healthcare (USA)
GST Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare (USA)
injekční stříkačky	B. Braun Melsungen AG (Německo)
kolona pro GST chromatografii	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)
kolona HiLoad™ 26/600 Superdex™ 75 pg	GE Healthcare (USA)
koncentrátory VIVASPIN TURBO 15	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG (Německo)
křemenné kyvety	Agilent technologies, Inc. (USA)
svorky na dialyzační membrány	SERVA Electrophoresis Gmbh (Německo)
plastové zkumavky	Thermo Fisher Scientific, Inc. (USA)
Shigemi kyvety	Shigemi, Inc. (Japonsko)

5 Metody

5.1 Exprese a purifikace DBD proteinů FOXO1 a FOXO3

5.1.1 Exprese DBD FOXO1 a FOXO3

Pro expresi DBD FOXO proteinů v této práci byl zvolen bakteriální expresní systém *E. coli*, kmen BL21(DE3). Gen pro lidskou DBD FOXO3 a myší DBD FOXO1 (lišící se od lidského v jedné aminokyselině na C-konci) byl vnesen do plasmidu pGEX-6P-1. Sekvence obou proteinů s mapou plazmidu pGEX-6P-1 jsou uvedeny v příloze, str. 105. Plazmidy nesoucí geny obou proteinů byly získány od prof. M. J. Ausserlechnera (Department of Pediatrics I, Medizinische Universität Innsbruck, Rakousko). DBD FOXO1 a FOXO3 byly exprimovány jako fúzní proteiny s glutathion-S-transferasovou afinitní kotvou na N-konci. Bakterie vybavené expresním vektorem pGEX-6P-1 jsou resistentní vůči antibiotiku ampicilinu. Exprese je pod kontrolou *lac* operátoru a je indukována isopropyl-β-1D-thiogalaktopyranosidem (IPTG), strukturním analogem metabolitu laktózy.

Buněčné kultury exprimující izotopově značený protein pro NMR experimenty byly kultivovány v obohaceném minimálním médiu, viz Exprese ^{15}N a ^{13}C značených proteinů, str. 38. Kultury exprimující protein pro ostatní experimenty byly kultivovány v LB médiu (podle Luria Bertani), složení viz tab. 10.1 v příloze, str. 106. Prvním krokem bylo založení bakteriálních kultur. Za sterilních podmínek bylo do skleněných zkumavek obsahujících 5 ml LB média pipetováno 5 µl ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml. Poté bylo do každé zkumavky přidáno 5 µl roztoku obsahujícího 700 µl buněčné kultury a 300 µl glycerolu. Takto bylo připraveno několik zkumavek s buněčnou kulturou, vždy jedna na jeden l LB média a tři na jeden l l minimálního média. Zkumavky byly uzavřeny kovovými víčky a byly přes noc inkubovány při teplotě 37 °C ve stolním orbitálním inkubátoru s rychlostí orbitálního pohybu 180 ot./min.

Přes noc narostlé buněčné kultury byly přeneseny do 2l Erlenmeyerových baněk obsahujících 1 l sterilního živného média a ampicilin o koncentraci 100 µg/ml. Buněčné kultury byly inkubovány při 37°C v orbitálním inkubátoru s rychlostí orbitálního pohybu 190 ot./min. Postupně byla měřena optická denzita buněčné kultury při vlnové délce 600 nm. Při OD_{600} = 0,6 cm^{-1} byla teplota snížena na 20 °C. Při OD_{600} = 0,8 cm^{-1} byla indukována exprese pomocí 0,5mM IPTG. Exprese probíhala při 20 °C po dobu 16–18 hodin. Druhý den byly buňěčné kultury sedimentovány v centrifuze při 2073×g a teplotě

4 °C. Sediment byl resuspendován ve 40 ml lyzačního pufru na 1 l buněčné kultury, složení viz tab. 10.2 v příloze, str. 106, a zamražen při −80 °C.

Exprese ^{15}N a ^{13}C značených proteinů: Pro NMR experimenty vyžadující 100% značení NMR aktivním izotopem, bylo potřeba zabezpečit, aby jediným zdrojem dusíku při proteinové expresi byl izotop ^{15}N a v případě proteinu pro 3D NMR experimenty zároveň jediným zdrojem uhlíku izotop ^{13}C. Pro tento účel byl využit ^{15}N značený chlorid amonný a ^{13}C značená D-glukóza. Exprese značených proteinů se liší pouze složením živného média pro růst bakterií. Pro expresi značených proteinů v této práci bylo použito obohacené minimální médium, informaci o jeho složení poskytl Ing. Václav Veverka, Ph.D (Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i.).

Příprava médií pro expresi značených proteinů probíhala následovně. První den byl do každé Erlenmeyerovy baňky přidán 1 g $^{15}NH_4Cl$, 100 ml roztoku 1, 1 ml roztoku 2 a 100 ml roztoku 3, složení roztoků viz tab. 10.4–10.6 v příloze, str. 106. Do každé baňky bylo přidáno 864 ml destilované vody a takto připravená média byla sterilizována. Druhý den bylo do každé Erlenmeyerovy baňky přidán 1 ml roztoku 4, 5, 6 a 7, složení roztoků viz tab. 10.7–10.10 v příloze, str. 106 a 107. Dále byly do každé baňky přidány 4 g ^{12}C, popř. ^{13}C, D-glukózy a ampicilin, jehož výsledná koncentrace byla 100 µg/ml. Z každého takto připraveného média bylo odebráno 10 ml.

Na každý litr minimálního média byly připraveny 3 skleněné zkumavky s buněčnou kulturou podle výše uvedeného postupu. Obsah zkumavek byl centrifugován při 2205×g po dobu 5 minut. LB médium bylo slito a buněčné kultury byly resuspendovány v odebraném objemu minimálního média. Do každé Erlenmeyerovy baňky bylo pak přidáno 10 ml resuspendované buněčné kultury. Dále bylo postupováno stejně jako při expresi neznačených proteinů.

5.1.2.Purifikace

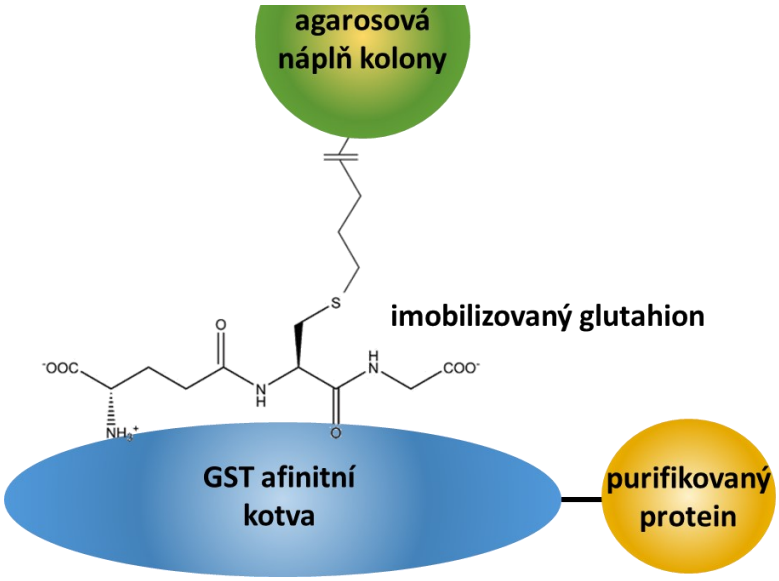
Purifikace DBD proteinů FOXO1 a FOXO3 zahrnuje několik kroků, jimiž jsou lyze buněk, GST afinitní chromatografie, odštěpení GST kotvy a gelová permeační chromatografie.

Lyze buněk: Lyze buněk je proces, kdy dochází k narušení buněčné stěny bakterií a uvolnění buněčného obsahu do lyzačního pufru. Buněčná suspenze byla při 4 °C inkubována s lysozymem, enzymem narušujícím buněčnou stěnu, o koncentraci 100 µg/ml

po dobu 45–60 minut. Následně byl přidán inhibitor serinových proteáz PMSF (z angl. phenylmethylsulfonyl fluoride) o koncentraci 5mM a v případě FOXO1 navíc jedna tabletka inhibitorů proteáz SIGMA*FAST*™ na 100 ml lyzačního pufru, složení viz tab. 10.2 v příloze, str. 106. Lyze buněk byla dokončena sonikací, kdy dochází k rozrušení bakteriální buněčné stěny působením ultrazvukových pulzů. Pulzy měly výkon cca 55 W, doba trvání pulzu byla 15 s, po pulzu vždy následovala 45 s pauza. Bylo provedeno 64-72 cyklů, celková doba pulzu tak byla 16–18 minut. Buněčná frakce byla sedimentována centrifugací při 20 000×g po dobu 45 minut při teplotě 4 °C.

GST afinitní chromatografie: GST afinitní chromatografie je založena na specifické interakci enzymu s jeho substrátem. Purifikované proteiny obsahují sekvenci enzymu glutathion-S-transferasy, GST, na N-konci. Substrátem GST je tripeptid glutathion (γ-glutamylcysteinyglycin), který je imobilizován prostřednictvím své sulfuhydrylové skupiny na agarosové náplni kolony, viz Obr 5.1 [71].

Na buněčný lyzát ze 3–4 litrů buněčné kultury byla použita plastová kolona naplněná 5–7 ml Glutathion Sepharosy® 4 Fast Flow. Buněčný lyzát byl za stálého míchání inkubován se stacionární fází kolony po dobu 45 minut při teplotě 4°C. Následně byla GST kolona promyta 300 ml pufru pro GST afinitní chromatografii, složení viz tab. 10.11 v příloze, str. 107. Protein navázaný na koloně byl eluován nadbytkem redukovaného glutathionu, složení elučního roztoku viz tab. 10.12 v příloze, str. 107. Eluovaný objem na buněčný lyzát ze tří litrů buněčné kultury byl 60 ml.



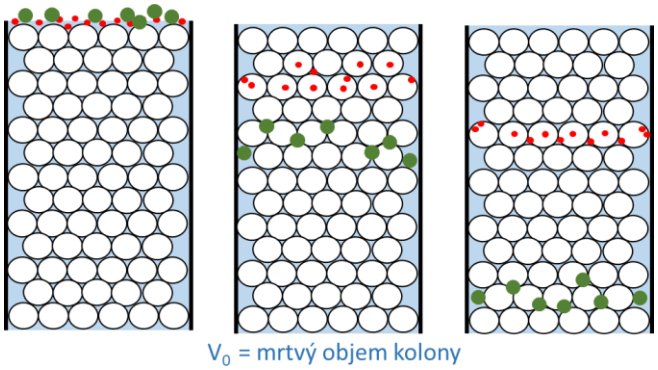
Obr. 5.1 Schéma GST afinitní chromatografie.

Dialýza a štěpení PreScission proteasou: Dialýza byla použita pro odstranění přebytečného glutathionu a udržení optimálních podmínek pro odštěpení GST kotvy za pomoci enzymu PreScission proteasy. Při dialýze přes polopropustnou membránu dochází k difúzi některých látek z prostředí o vyšší koncentraci do prostředí s nižší koncentrací dané látky. Použitá polopropustná dialyzační membrána umožňuje průchod molekul menších, než je velikost jejích pórů. Eluovaný roztok proteinu byl umístěn do dialyzační membrány s póry propustnými pro molekuly do molekulové hmotnosti 6–8 kDa. Roztok proteinu byl dialyzován při 4 °C do optimálního pufru pro štěpení pomocí PreScission proteasy, složení viz tab. 10.13 v příloze, str. 107.

Pro experimenty provedené v této práci byla přítomnost GST afinitní kotvy nežádoucí a byla proto odštěpena. PreScission proteasa rozpoznává sekvenci LGVLFQGP a štěpí ji mezi glutaminem a glycinem. Pro kvantitativní odštěpení afinitní kotvy bylo použito 10 U PreScission proteasy na 1 mg štěpeného proteinu, výtěžek purifikace před štěpením byl určen pomocí vztahu (2), str. 42. Štěpení probíhalo přes noc během výše uvedené dialýzy při teplotě 4 °C.

Gelová permeační chromatografie: Gelová permeační chromatografie je hydrodynamickou metodou sloužící k oddělení složek směsi na základě jejich různého hydrodynamického poloměru. Stacionární fází gelové permeační chromatografie je porézní gel. Molekuly s malým hydrodynamickým poloměrem, difundují systémem pórů a jsou zdržovány tím více, čím menší je jejich poloměr. Molekuly s hydrodynamickým poloměrem větším, než je rozměr pórů, putují mrtvým objemem kolony s rychlostí průtoku mobilní fáze, viz obr. 5.2, str. 41.

Objem roztoku proteinu dávkovaného na kolonu byl 1,5–1,7 ml. Výsledného objemu bylo dosaženo ultrafiltrací v centrifuze při 1400–1600×g a teplotě 4 °C. Protein byl koncentrován v koncentrátoru s membránou propustnou pro molekuly s molekulovou hmotností nižší než 10 kDa. Jako mobilní fáze pro gelovou permeační chromatografii byl použit 50mM Tris-HCl pufr o pH 7,5, složení viz tab. 10.14 v příloze, str. 107, s rychlostí průtoku 1,5 ml/min. Pro všechny purifikace v této práci byla použita kolona HiLoad™ 26/600 Superdex™ 75 pg.



Obr. 5.2 Schéma dělení složek směsi na základě různého hydrodynamického poloměru pomocí gelové permeační chromatografie.

SDS-PAGE: Čistota purifikovaného proteinu byla po každém kroku purifikace kontrolována pomocí SDS-PAGE (z angl. sodium dodecylsulphate polyacryleamide gel electrophoresis). SDS-PAGE je analytickou metodou separace bílkovin na základě různé elektroforetické mobility v polyakrylamidovém gelu. Elektroforéza probíhá za denaturujících podmínek v přítomnosti detergentu dodecylsíranu sodného. Dodecylsíran sodný se naváže na protein a udělí mu záporný náboj, který je rozdělen uniformně na jednotku hmoty. Během denaturující SDS-PAGE tak molekuly proteinů putují v prostředí polyakrylamidového gelu směrem k anodě s různou rychlostí v závislosti na jejich relativní molekulové hmotnosti. Pro SDS-PAGE byl použit 15% polyakrylamidový gel převrstvený 4% zaostřovacím gelem, složení gelů viz tab. 10.16 a 10.17 v příloze, str. 108.

Při přípravě vzorků pro SDS-PAGE bylo pipetováno 10 µl analyzovaného proteinového roztoku a 5 µl vzorkového pufru, složení viz tab. 10.20 v příloze, str. 108. Pro úplnou denaturaci a snadnější navázání dodecylsíranu sodného byly vzorky zahřívány po dobu pěti minut při teplotě 95 °C. SDS-PAGE probíhala v elektroforetické vaně naplněné 1× koncentrovaným pufrem pro SDS elektroforézu, složení 10× kocentrovaného pufru viz tab. 10.19 v příloze, str. 108, při napětí 200 V po dobu jedné hodiny. Gely byly vizualizovány pomocí Coomassie Brilliant Blue podle protokolu popsaném v literatuře [72], složení barvícího roztoku viz tab. 10.21 v příloze, str. 108.

Měření proteinové koncentrace a určení výtěžku purifikace: Proteinovou koncentraci je možné stanovit na základě měření absorbance při 280 nm, kde absorbují aromatické aminokyseliny tyrosin a tryptofan. Koncentraci proteinu v mol dm^{-3} je možné vypočíst dle vztahu

$$c = \frac{A_{280}}{\varepsilon_{280} \cdot l}, \qquad (1)$$

kde A_{280} je absorbance při 280 nm, l je délka optické dráhy v cm a ε_{280} je molární absorpční koeficient při 280 nm v M^{-1} cm^{-1}. Molární absorpční koeficienty byly stanoveny na základě zastoupení aminokyselin tyrosinu a tryptofanu v aminokyselinové sekvenci pomocí programu ProtParam, dostupném z [73], a jsou uvedeny v příloze, str. 105.

Výtěžek purifikace byl vypočten dle vztahu

$$m = V \cdot c \cdot M, \tag{2}$$

kde m je hmotnost proteinu v g, c je jeho koncentrace v mol dm^{-3}, V jeho objem v dm^3 a M molekulová hmotnost v g mol^{-1}. Molekulové hmotnosti byly vypočteny pomocí programu ProtParam, dostupném z [73], a jsou uvedeny v příloze, str. 105.

5.2 Metody řešení proteinové struktury pomocí NMR

NMR, nukleární magnetická rezonance, je spektrální metodou využívající magnetické vlastnosti jader některých izotopů. Jádra s nenulovým spinovým kvantovým číslem I mají zároveň nenulový magnetický dipólový moment μ. Nejčastěji měřená jádra jsou ta se spinovým kvantovým číslem ½, mezi něž patří jádra ^1H, ^{15}N a ^{13}C. Jádra ^1H mají z těchto jader nejvyšší přirozené zastoupení (99,99 %) a zároveň nejvyšší citlivost [74].

V přítomnosti magnetického pole s indukcí B_z jsou energetické hladiny jader se spinovým kvantovým číslem ½ štěpeny na dvě hladiny. Rezonanční podmínku vyjadřuje vztah

$$\upsilon = \frac{\gamma B_z}{2\pi}, \tag{3}$$

kde υ je rezonanční frekvence daného jádra, pohybuje se v řádu MHz, γ je gyromagnetický poměr, charakteristická konstanta pro dané jádro. Efektivní hodnota B_z je pro jeden typ jader různá v závislosti na jejich chemickém okolí. Magnetické pole je totiž různě stíněno okolními elektrony [74].

NMR spektrum je závislostí intenzity na chemickém posunu, který je definován vztahem:

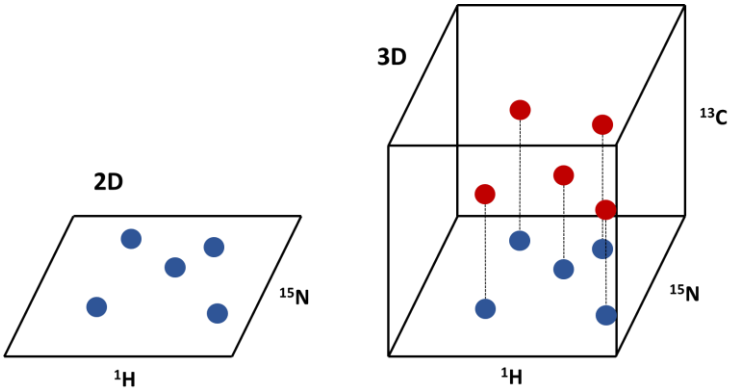
$$\delta = \frac{\upsilon - \upsilon_0}{\upsilon_0} \cdot 10^6, \tag{4}$$

kde υ je rezonanční frekvence daného jádra a υ_0 je rezonanční frekvence referenčního jádra. Chemický posun se udává v ppm [74].

Pro vyřešení struktury proteinu pomocí NMR je nutné přiřazení chemických posunů

atomů jak hlavního řetězce, tak postranních řetězců molekuly proteinu. Informace obsažené ve spektrech poskytnou řadu omezení pro výpočet proteinové struktury. Pro vyřešení struktury DBD FOXO1 byly použity standardní 2D a 3D experimenty. 2D a 3D experimenty korelují chemické posuny 2, resp. 3 typů jader a umožňují zředění informace obsažené v 1D spektru, viz obr. 5.3. Během vícedimenzionálních experimentů je excitován jeden typ jader, magnetizace se dále přenáší na ostatní typy jader prostřednictvím *J* interakce, která je zprostředkována elektrony [74].

Dále jsou uvedeny použité experimenty a jejich schémata s jádry, jejichž chemické posuny jsou ve spektrech korelovány, vyznačenými fialově. Vyhodnocení spekter bylo provedeno v programu Sparky 3.133 [75].



Obr. 5.3 Zjednodušené schéma 2D a 3D experimentu. Vlevo 2D experiment korelující chemické posuny dusíku a vodíku. Vpravo 3D experiment korelující chemické posuny vodíku, dusíku a uhlíku.

5.2.1 Příprava vzorku pro řešení struktury DBD FOXO1

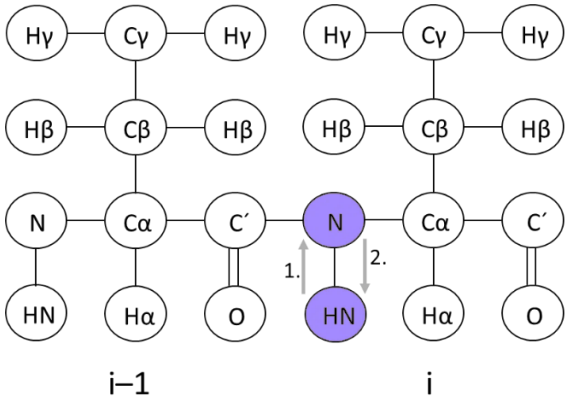
Pro obdržení NMR spekter nutných pro výpočet struktury DBD FOXO1 byl připraven vzorek 380 µM proteinu ve 20mM fosfátovém pufru o pH 6,5 s 10% $^{2}H_2O$, složení viz tab. 10.26 v příloze, str. 109. Celkový objem vzorku byl 350 µl, měření probíhalo v Shigemi kyvetě. Spektra byla měřena při 25 °C na 600MHz spektrometru Bruker Avance III (Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy) a 850MHz spektrometru Bruker Avance III v případě NOE experimentů (Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.). Oba spektrometry byly vybaveny $^{1}H/^{13}C/^{15}N$ kryosondou.

5.2.2 Přiřazení rezonancí hlavního řetězce

Pro přiřazení rezonancí hlavního řetězce byly použity standardní 2D a 3D

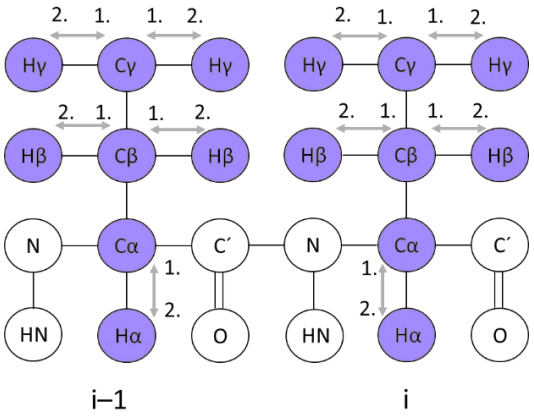
experimenty. 3D experimenty korelují chemické posuny tří typů jader a vyžadovaly tak 100% značení izotopy ^{13}C a ^{15}N. Společným rysem 3D experimentů je podstava tvořená 2D ^{1}H-^{15}N HSQC spektrem, čehož lze při rezonančním přiřazení signálů tohoto spektra využít.

2D ^{1}H-^{15}N HSQC experiment: 2D ^{1}H-^{15}N HSQC (z angl. heteronuclar single quantum coherence) experiment koreluje chemické posuny vodíku a dusíku N-H skupin molekuly proteinu, schéma experimentu viz. obr. 5.4. Většina píků v ^{1}H-^{15}N HSQC spektru pochází od N-H skupin peptidové vazby, ve spektru jsou ale vidět i N-H skupiny postranních řetězců tryptofanu, asparaginu a glutaminu [74], [76].



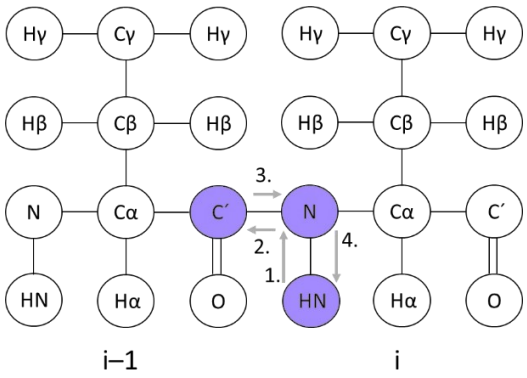
Obr. 5.4 Schéma 2D ^{1}H-^{15}N HSQC experimentu. Experiment koreluje chemické posuny vodíku a dusíku N-H skupin proteinu. Magnetizace je přenesena prostřednictvím *J* interakce z vodíku na dusík a zpět [76].

2D ^{1}H-^{13}C HMQC experiment: ^{1}H-^{13}C HMQC experiment (z angl. heteronuclear multiple quantum coherence) koreluje chemický posun vodíků a uhlíků. Každé C-H skupině ve spektru přísluší pík, schéma experimentu viz. obr. 5.5, str. 45 [74], [76]. Přiřazení rezonancí v ^{1}H-^{13}C HMQC spektru provedla RNDr. Katarína Pšenáková, Ph.D. (z naší výzkumné skupiny) ve spolupráci s Ing. Václavem Veverkou, Ph.D (Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i.).



Obr. 5.5 Schéma 2D ^{1}H-^{13}C HMQC experimentu. Experiment koreluje chemické posuny uhlíku a vodíku C-H skupin proteinu. Magnetizace je prostřednictvím *J* interakce přenesena z vodíků na uhlíky a zpět [76].

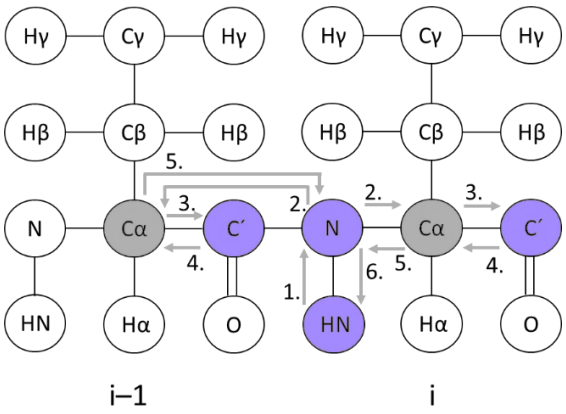
HNCO experiment: 3D HNCO experiment koreluje chemické posuny karbonylového uhlíku, amidického dusíku a amidického vodíku. Ve spektru je korelován chemický posun vodíku a dusíku i-té aminokyseliny s posunem karbonylové skupiny i−1 aminokyseliny, schéma experimentu viz. obr. 5.6 [77], [76]. HNCO experiment byl použit v kombinaci s HN(CA)CO experimentem pro přiřazení rezonancí hlavního řetězce DBD FOXO1 a ^{1}H-^{15}N HSQC experimentu, schéma postupu je naznačeno na obr. 5.8, str. 46. Chemické posuny karbonylových uhlíků hlavního řetězce byly využity pro predikci torzních úhlů proteinové páteře Φ a Ψ pomocí programu TALOS+, viz kapitola 5.2.5, str. 52.



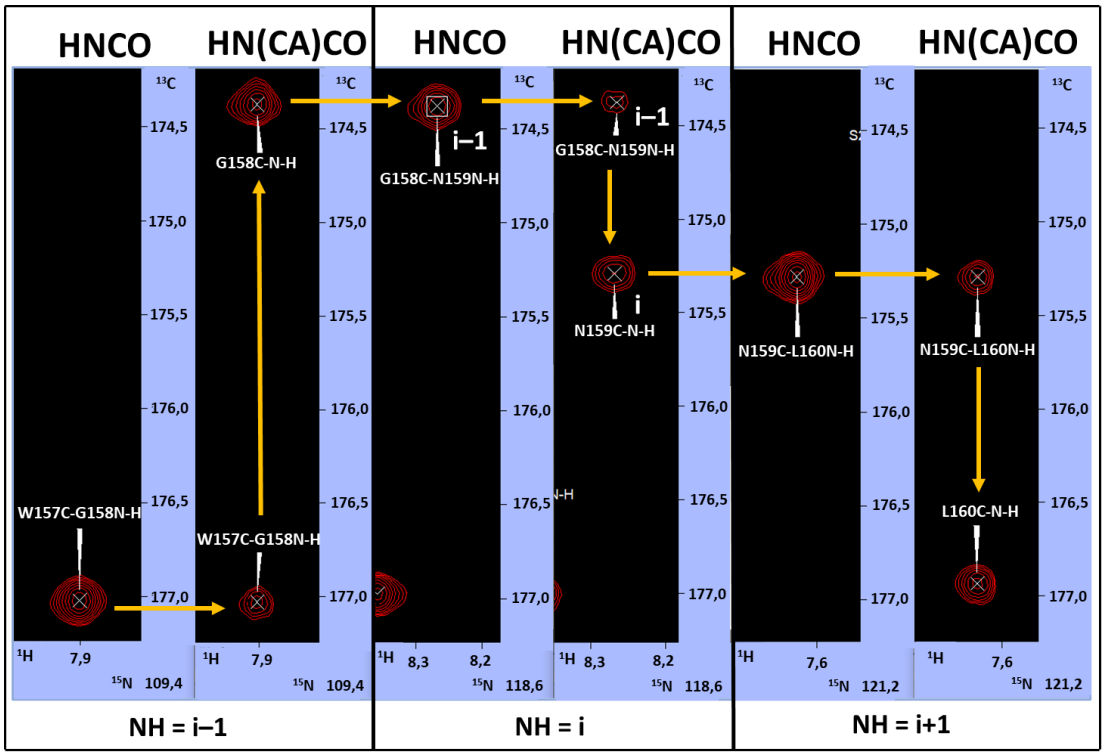
Obr. 5.6 Schéma HNCO experimentu. Experiment koreluje chemické posuny amidického dusíku a vodíku s chemickým posunem karbonylového uhlíku i−1 aminokyseliny. Magnetizace je v tomto experimentu přenesena prostřednictvím *J* interakce z amidického vodíku na dusík a poté selektivně na karbonylový uhlík a zpět [76].

HN(CA)CO experiment: 3D HN(CA)CO experiment koreluje chemické posuny karbonylového uhlíku, amidického dusíku a amidického vodíku. Ke každé N-H skupině jsou v HN(CA)CO experimentu korelovány dva karbonylové uhlíky, jeden patří i-té a jeden i−1 aminokyselině. Přičemž platí, že pík i-tého karbonylového uhlíku je intenzivnější,

schéma experimentu viz obr. 5.7 [78], [76]. Spektrum bylo použito spolu s HNCO pro rezonanční přiřazení signálů hlavního řetězce DBD FOXO1 a ^{1}H-^{15}N HSQC experimentu, postup viz obr. 5.8.

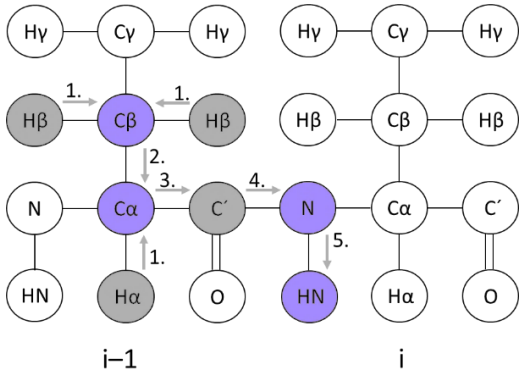


Obr. 5.7 Schéma HN(CA)CO experimentu. Experiment koreluje chemické posuny karbonylového uhlíku, amidického dusíku a amidického vodíku. Magnetizace je v tomto experimentu přenesena prostřednictvím *J* interakce z amidického vodíku na dusík, poté selektivně na α uhlík i-té a i−1 aminokyseliny a na karbonylový uhlík. Pro detekci je magnetizace přenesena stejným způsobem zpět na amidický vodík. Šedě jsou vyznačena jádra jejichž chemickým posunem se magnetizace nevyvíjí [76].



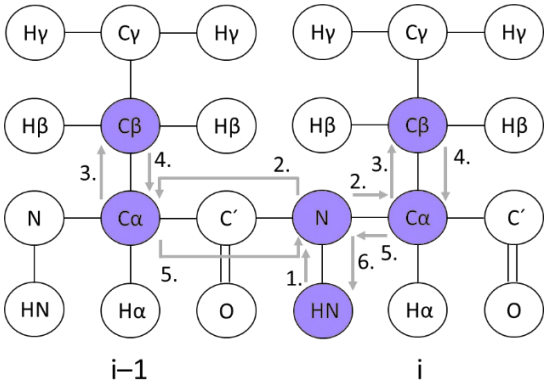
Obr. 5.8 Využití HNCO a HN(CA)CO experimentů k rezonančnímu přiřazení signálů hlavního řetězce DBD FOXO1 a ^{1}H-^{15}N HSQC experimentu. Máme-li přiřezení i-té N-H skupiny (panel uprostřed), kombinace HNCO a HN(CA)CO spekter umožní přiřezení i+1 (vpravo) a i−1 (vlevo) N-H skupiny na základě chemických posunů karbonylových uhlíků (vyznačeno šipkami).

CBCA(CO)NH experiment: 3D CBCA(CO)NH experiment koreluje chemické posuny N-H skupiny s chemickými posuny C_α a C_β i−1 aminokyseliny, viz obr. 5.9 [79], [76]. Experiment byl použit v kombinaci s HNCACB experimentem pro rezonanční přiřazení signálů hlavního řetězce DBD FOXO1 a ^{1}H-^{15}N HSQC experimentu. Postup viz obr. 5.11, str. 48. Chemické posuny C_α a C_β uhlíků hlavního řetězce byly využity pro predikci torzních úhlů proteinové páteře Φ a Ψ pomocí programu TALOS+, viz kapitola 5.2.5, str. 52.

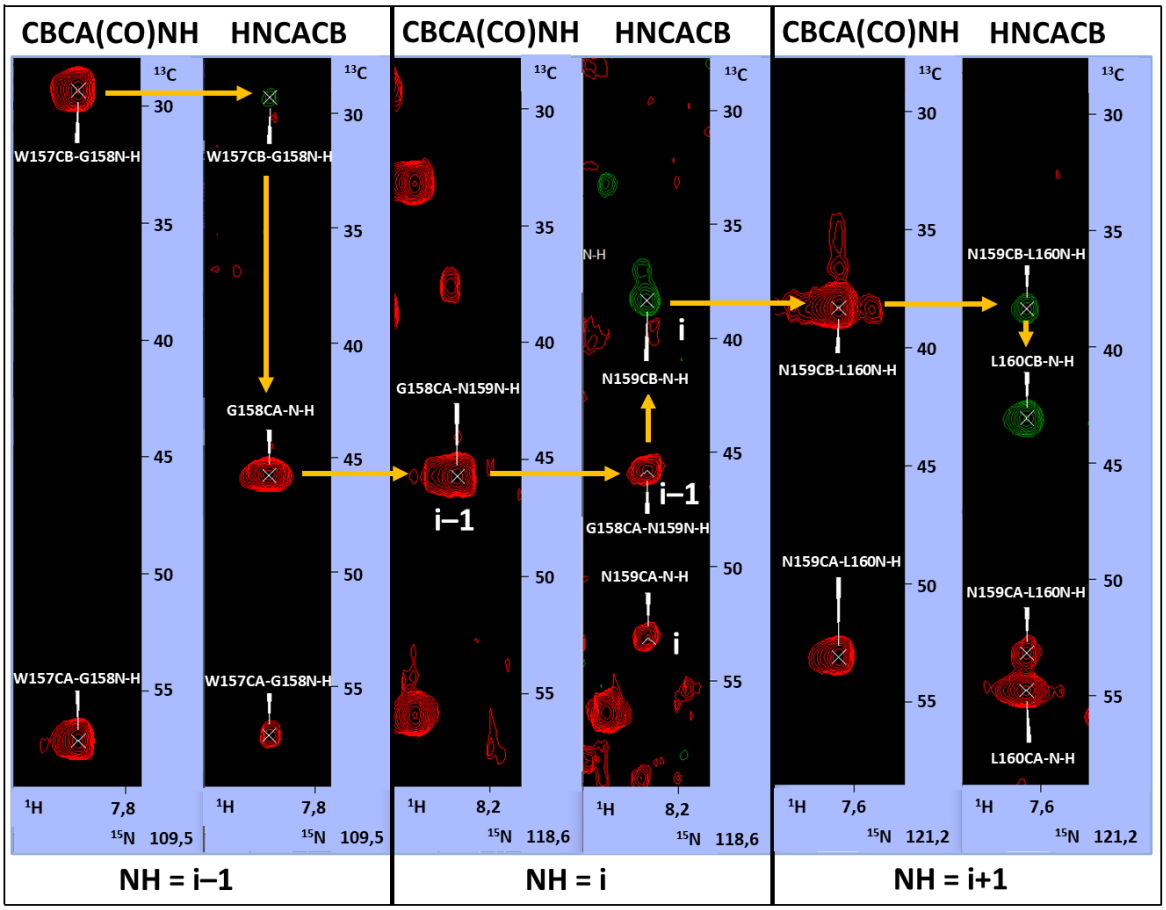


Obr. 5.9 Schéma CBCA(CO)NH experimentu. Experiment koreluje chemické posuny N-H skupiny s chemickými posuny C_α a C_β i−1 aminokyseliny. Magnetizace se přenáší z H_α a H_β na uhlík C_α, resp. C_β, poté je přenesena na karbonylový uhlík, amidický dusík a nakonec na amidický vodík, kde je detekována. Vývoj magnetizace chemickým posunem C_α a C_β probíhá simultánně, jejich chemické posuny tak tvoří jednu dimenzi. Další dvě dimenze patří amidickému vodíku a dusíku. Šedě jsou vyznačena jádra jejichž chemickým posunem se magnetizace nevyvíjí [76].

HNCACB experiment: 3D HNCACB experiment koreluje chemické posuny amidického dusíku a vodíku s chemickými posuny α a β uhlíků i-té a i−1 aminokyseliny, schéma experimentu viz. obr. 5.10, str. 48. Ke každé N-H skupině, kromě glycinu, jsou ve spektru dva C_β signály a dva C_α signály, přičemž uhlíkové signály i-té aminokyseliny jsou intenzivnější. Experiment byl použit v kombinaci s CBCA(CO)NH pro přiřazení rezonancí hlavního řetězce DBD FOXO1 a ^{1}H-^{15}N HSQC experimentu, postup viz obr. 5.11, str. 48, [79], [76].



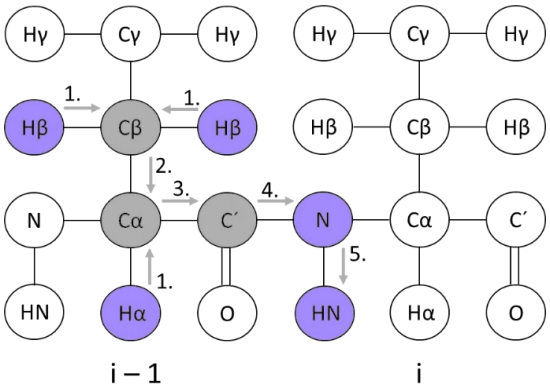
Obr. 5.10 Schéma HNCACB experimentu. Experiment koreluje chemické posuny amidického dusíku a vodíku s chemickými posuny α a β uhlíků i-té a i−1 aminokyseliny . Magnetizace se přenáší z amidického vodíku na dusík, poté na C_α a C_β uhlíky a stejnou cestou zpátky, kde je detekována. Vývoj magnetizace chemickým posunem C_α a C_β probíhá simultánně, oba tak tvoří jednu dimenzi, zbylé dvě náleží amidickému dusíku a vodíku [76].



Obr. 5.11 Postup rezonančního přiřazení přiřazení signálů hlavního řetězce DBD FOXO1 a ^{1}H-^{15}N HSQC spektra pomocí HNCACB a CBCA(CO)NH experimentů. Máme-li přiřezení i-té N-H skupiny (panel uprostřed), kombinace HNCACB a CBCA(CO)NH spekter umožní přiřezení i+1 (vpravo) a i−1 (vlevo) N-H skupiny na základě chemických posunů α a β uhlíků (vyznačeno šipkami).

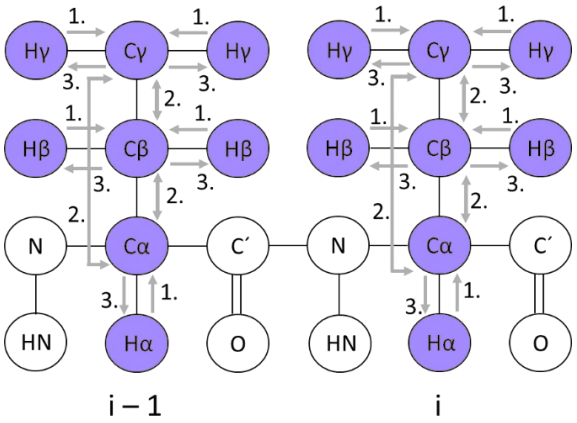
5.2.3 Přiřazení rezonancí postranních řetězců aminokyselin

HBHA(CO)NH experiment: 3D HBHA(CO)NH experiment koreluje chemický posun α a β vodíků s chemickými posuny amidického dusíku a vodíku. Spektrum má dvě vodíkové a jednu dusíkovou dimenzi, schéma experimentu viz obr. 5.12, [80], [76]. Tento experiment umožňuje přiřadit chemické posuny H_α a H_β vodíků.

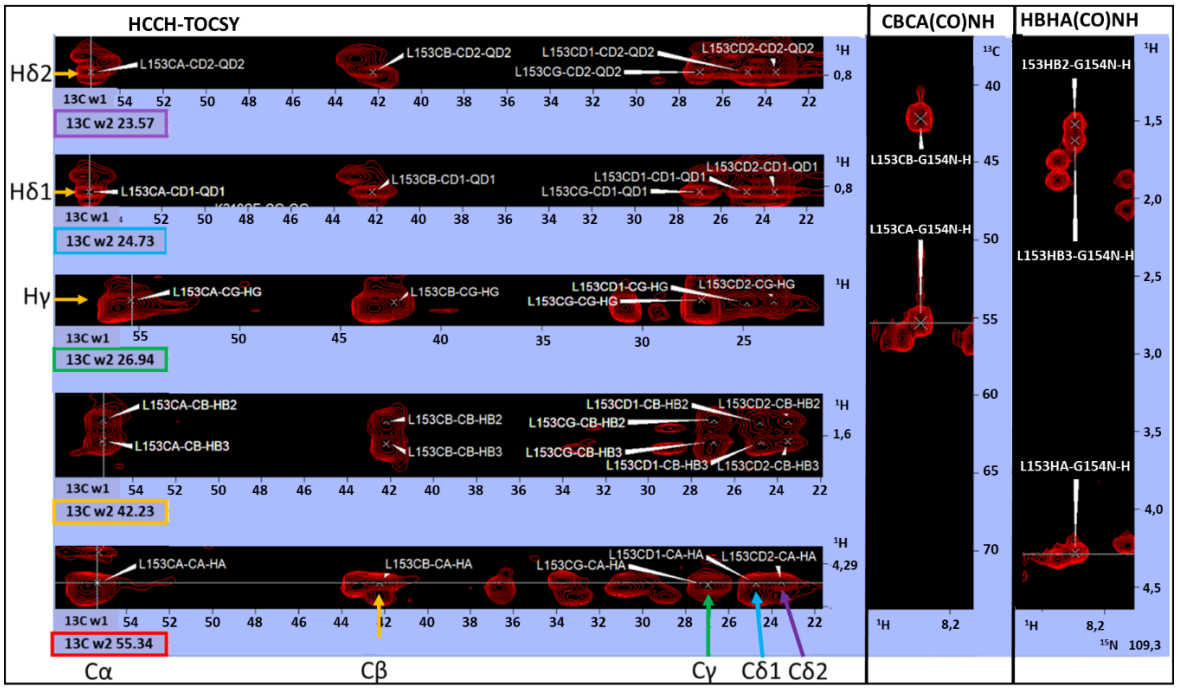


Obr. 5.12 Schéma HBHA(CO)NH experimentu. Experiment koreluje chemický posun α a β vodíků s chemickými posuny amidického dusíku a vodíku. Magnetizace se přenáší z H_α a H_β na C_β a C_α, poté je přenesena pouze na C_α, odkud se přenáší na karbonylový uhlík a následně na amidický dusík, nakonec je přenesena na amidický vodík a detekována. Šedě jsou vyznačena jádra jejichž chemickým posunem se magnetizace nevyvíjí [76].

HCCH-TOCSY experiment: 3D HCCH-TOCSY experiment (z angl. heteronuclear single quantum coherence-total correaltion spectroscopy) slouží k přiřazení rezonancí postranního řetězce. Rezonanci jedné C-H skupiny přísluší ve spektru korelace na všechny vodíkové atomy postranního řetězce i-té aminokyseliny, schéma viz. obr. 5.13, str. 50, [81], [76]. HCCH-TOCSY experiment byl použit pro přiřazení rezonancí ^{13}C a ^{1}H atomů postranních řetězců, postup viz. obr. 5.14, str. 50.

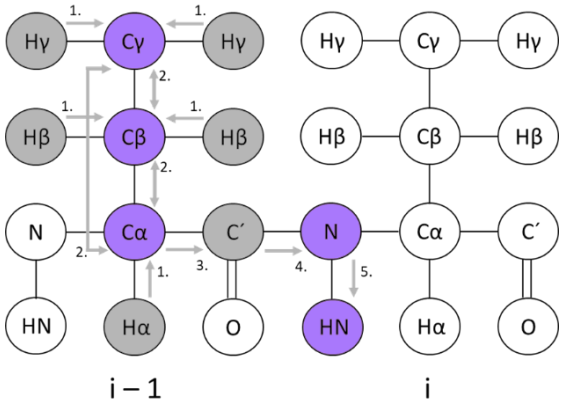


Obr. 5.13 Schéma HCCH-TOCSY experimentu. Magnetizace je v tomto experimentu přenesena z vodíků na přímo navázané uhlíky, následuje isotropní směšování, kdy se magnetizace volně přelévá mezi uhlíky, a přenos magnetizace zpět na vodíky, kde je detekována. Experiment má jednu vodíkovou a dvě uhlíkové dimenze [76].



Obr. 5.14 Přiřazení rezonancí postranních řetězců pomocí HBHA(CO)NH, CBCA(CO)NH a HCCH-TOCSY. Pomocí CBCA(CO)NH a HBHA(CO)NH lze přiřadit α a β vodíky a uhlíky, HCCH-TOCSY spektrum umožňuje na základě této informace přiřadit ostatní vodíky a uhlíky dané aminokyseliny. Pozn.: L153 a G154 jsou pozůstatky GST afinitní kotvy.

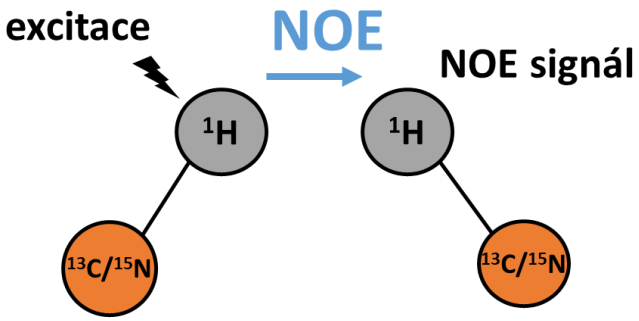
CC(CO)NH experiment: 3D CC(CO)NH experiment koreluje chemické posuny amidického vodíku a dusíku s chemickými posuny uhlíků i−1 aminokyseliny, schéma viz obr. 5.15, str. 51, [82], [76]. Spektrum slouží k přiřazení uhlíkových rezonancí postranního řetězce. Přiřazení rezonancí provedla RNDr. Katarína Pšenáková, Ph.D (z naší výzkumné skupiny).



Obr. 5.15 Schéma CC(CO)NH experimentu. Experiment koreluje chemické posuny amidického vodíku a dusíku s chemickými posuny uhlíků i−1 aminokyseliny. Magnetizace je přenesena z vodíků postranního řetězce na sousední uhlíky, poté dochází k isotropnímu směšování, kdy se magnetizace volně přelévá mezi všemi uhlíky postranního řetězce dané aminokyseliny. Následně je magnetizace přenesena na karbonylový uhlík, dále na amidický dusík a nakonec na amidický vodík, kde je detekována. Šedě jsou vyznačena jádra jejichž chemickým posunem se magnetizace nevyvíjí [76].

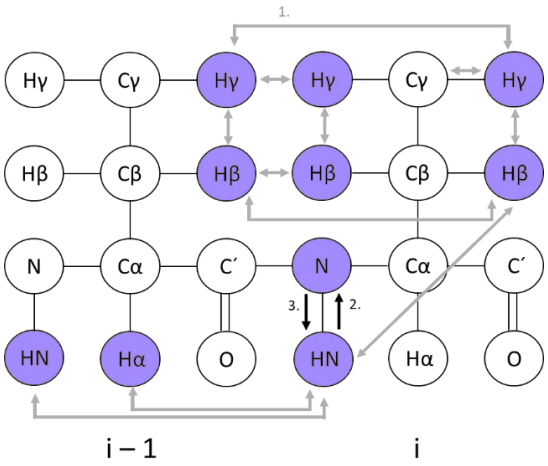
5.2.4 Experimenty založené na NOE

Řada experimentů pro určení struktury pomocí NMR využívá tzv. NOE, nukleárního Overhauserova efektu. Magnetizace se zde přenáší přímou interakcí spinů dvou jader přes prostor, viz obr. 5.16. Intenzita signálu/píku je dána prostorovou vzdáleností těchto jader [74]. Tyto experimenty tak poskytují vzdálenostní omezení pro výpočet struktury.



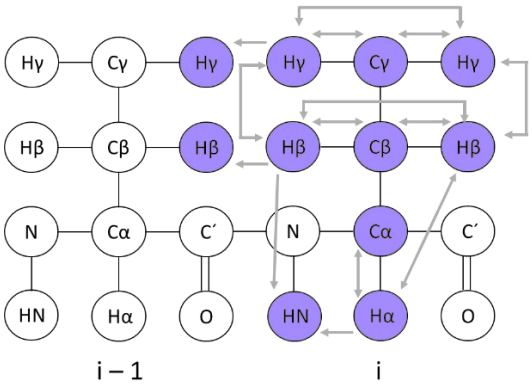
Obr. 5.16 Schéma nukleárního Overhauserova efektu. Magnetizace se přenáší přímou spin-spinovou interakcí dvou ^{1}H jader přes prostor.

^{1}H-^{15}N NOESY-HSQC experiment: 3 D ^{1}H-^{15}N NOESY-HSQC experiment koreluje chemické posuny amidického vodíku a dusíku s chemickými posuny všech vodíků blízko v prostoru, schéma viz obr. 5.17, str. 52, [83], [76]. Tento experiment poskytl vzdálenostní omezení pro výpočet struktury DBD FOXO1, viz kapitola 5.2.5, str. 52. Rezonanční přiřazení spektra bylo provedeno automaticky v programu Cyana 3.98.



Obr. 5.17 Schéma ^{1}H-^{15}N NOESY-HSQC experimentu. Experiment koreluje chemické posuny amidického vodíku a dusíku s chemickými posuny všech vodíků blízko v prostoru. V prvním kroce se magnetizace přenáší mezi vodíky prostřednictvím NOE, poté je přenesena na amidický dusík a na amidický vodík, kde je detekována [76].

^{1}H-^{13}C HMQC-NOESY experiment: 3D ^{1}H-^{13}C HMQC-NOESY experiment koreluje chemické posuny vodíku a uhlíku C-H skupin s chemickými posuny všech vodíků blízko v prostoru, schéma experimentu viz obr. 5.18, [84], [76]. Tento experiment poskytl vzdálenostní omezení pro výpočet struktury DBD FOXO1, viz kapitola 5.2.5 níže. Rezonanční přiřazení spektra bylo provedeno automaticky v programu Cyana 3.98.

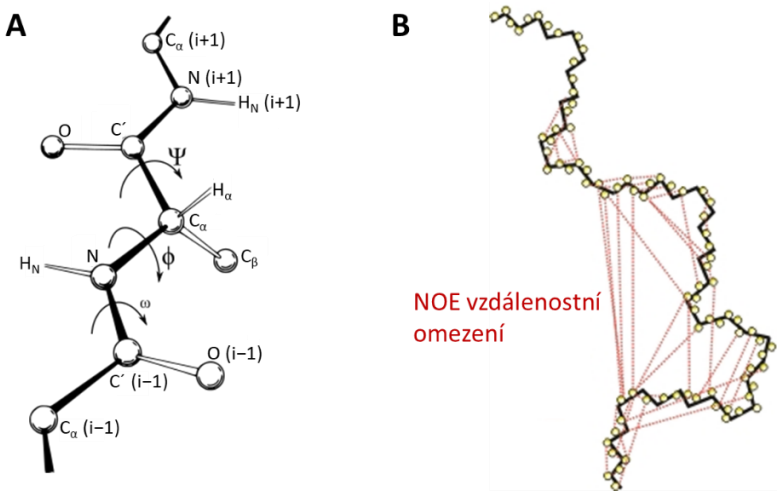


Obr. 5.18 Schéma ^{1}H-^{13}C HMQC-NOESY experimentu. Experiment koreluje chemické posuny vodíku a uhlíku C-H skupin s chemickými posuny všech vodíků blízko v prostoru. Magnetizace je prostřednictvím *J* interakce přenesena z vodíků na uhlíky a zpět, následuje přenos magnetizace na všechna ^{1}H jádra blízko v prostoru prostřednictvím NOE a detekce [76].

5.2.5 Výpočet struktury

Výpočet struktury provedl Ing. Václav Veverka, Ph.D (Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i.). Spektra založená na NOE poskytla vzdálenostní omezení pro výpočet proteinové struktury, viz obr. 5.19, str. 53. Omezení pro torzní úhly proteinové páteře (Φ a Ψ, viz obr. 5.19, str. 53) byly určeny pomocí chemických posunů H_N, H_α, C_α,

C_β, C´ a N atomů proteinové páteře programem TALOS+ [85].



Obr. 5.19 Omezení pro výpočet struktury získaná z NMR spekter. A Torzní úhly proteinové páteře Φ a Ψ byly předpovězeny na základě chemických posunů H_N, Hα, Cα, C_β, C´ a N atomů pomocí programu TALOS+ [84]. Převzato a upraveno z [86] **B** Vzdálenostní omezení získaná pomocí NOE spekter. Převzato a upraveno z [87].

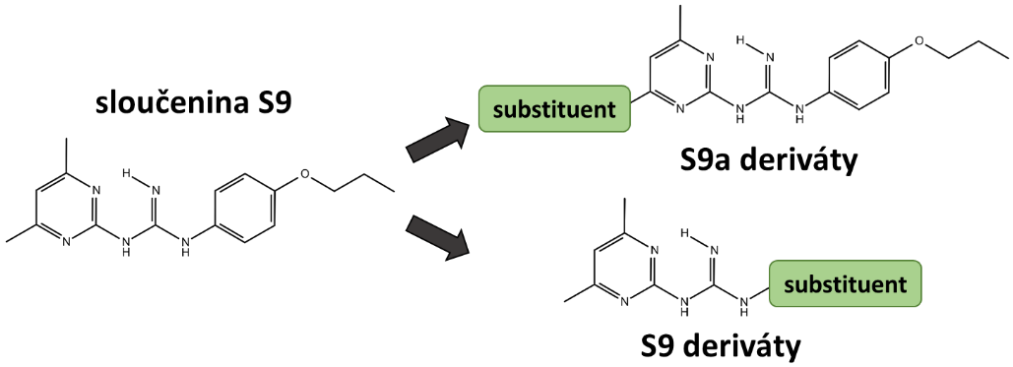
První set struktur byl získán pomocí programu Cyana 3.98 za využití kombinovaného přiřazení NOE spekter a určení struktury – Candid (z angl. combined automated NOE assignment and structure determination protocol) [88], následovaného pěti cykly simulovaného žíhání s omezením dihedrálních úhlů – Redac (z angl. redundant dihedral angle constraint) [89]. Soubor struktur, které byly v souladu se strukturním omezením, získaný pomocí programu Cyana 3.98 byl na závěr podroben molekulové dynamice s explicitním rozpouštědlem v programu YASARA (z angl. yet another scientific artificial reality application) [90].

5.3 Studium inhibitorů interakce FOXO3 s DNA

5.3.1 Studované inhibitory a odhad koncentrace jejich nasycených roztoků

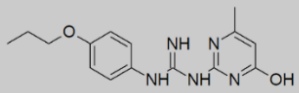
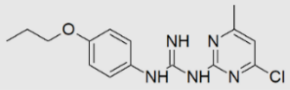
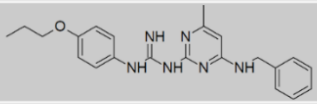
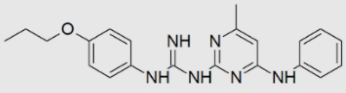
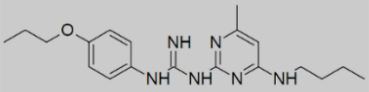
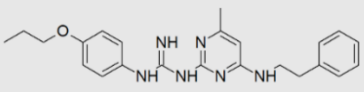
V předchozí studii byla identifikována sloučenina S9, která je schopna inhibovat transkripční aktivitu FOXO3 v tkáňových kulturách buněk lidského neuroblatomu (buňky SH-EP linie). Experimenty na tkáňových kulturách provedla laboratoř prof. M. J. Ausserlechnera (Department of Pediatrics I, Medizinische Universität Innsbruck, Rakousko). Sloučenina S9 interaguje s DBD FOXO3, a tím blokuje jeho interakci s DNA [69], [70].

Původní sloučenina S9 byla chemicky modifikována s cílem vylepšit její schopnost inhibovat vazbu FOXO3 na DNA, ale i např. zvýšit její rozpustnost. Modifikací pyrimidinového kruhu a guanidinové skupiny vznikly dvě řady derivátů, viz obr. 5.20. Modifikované inhibitory byly navrženy a syntetizovány skupinou doc. Jana Veselého, Ph.D. (Laboratoř organokatalýzy a enantioselektivní syntézy, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy). Deriváty studované v této práci jsou uvedeny v Tab. 5.1 a Tab. 5.2, str. 55. Paralelně byl efekt derivátů sloučeniny S9 na transkripční aktivitu FOXO3 testován na tkáňových kulturách v laboratoři prof. M. J. Ausserlechnera (Department of Pediatrics I, Medizinische Universität Innsbruck, Rakousko).

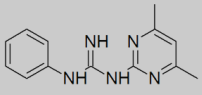
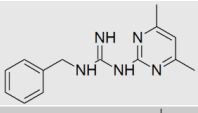
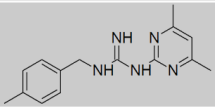
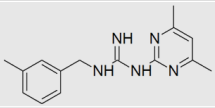
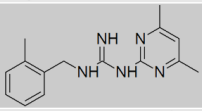
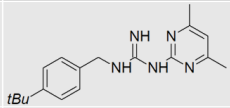
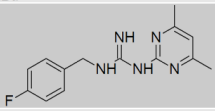
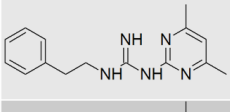
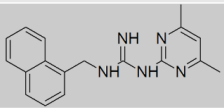


Obr. 5.20 Schéma modifikace původní sloučeniny S9. Pyrimidinový kruh a guanidinová skupina byly modifikovány za účelem zlepšení inhibiční schopnosti a rozpustnosti nových derivátů.

Tab. 5.1 – Inhibitory řady S9a

Název	Vzorec	Molární hmotnost /g mol^{-1}	Rozpustnost v pufru pro NMR měření /mmol dm^{-3}	HSQC koncentrace /mmol dm^{-3}	STD koncentrace /mmol dm^{-3}
S9a_1		301,35	~ 0,1	-	-
S9a_2		319,79	19	-	1
S9a_3		390,491	0,2	-	-
S9a_4		376,46	0,2	0,1	-
S9a_5		356,47	1,2	-	1
S9a_6		404,52	0,25	0,2	-

Tab. 5.2 – Inhibitory řady S9

Název	Vzorec	Molární hmotnost /g mol^{-1}	Rozpustnost v pufru pro NMR měření /mmol dm^{-3}	HSQC koncentrace /mmol dm^{-3}	STD koncentrace /mmol dm^{-3}
S9_2		241,30	4	-	1
S9_10		255,33	10	-	1
S9_14		269,35	7	-	1
S9_15		269,35	6	-	1
S9_16		269,35	2	-	1
S9_17		311,43	0,25	-	0,2
S9_18		273,32	8	-	1
S9_19		269,35	12	0,2–10	1
S9_20		305,39	0,65	0,6	-

Odhad koncentrace nasycených roztoků inhibitorů: Pro experimenty provedené v této práci byly připraveny roztoky inhibitorů ve 20mM fosfátovém pufru o pH 6,5, složení viz tab. 10.22 v příloze, str. 108. Jelikož všechny inhibitory nebyly v tomto pufru dobře rozpustné, bylo nutné provést odhad koncentrace jejich nasyceného roztoku. Pro odhad koncentrace byla použita jednobodová kalibrace. Byly připraveny roztoky o známé koncentraci rozpuštěním přesné navážky inhibitorů v DMSO. Tyto standardní roztoky byly 1000× zředěny fosfátovým pufrem a bylo proměřeno jejich absorpční spektrum. Roztoky inhibitorů v pufru byly centrifugovány, byl odebrán supernatant, který byl následně 10–100× zředěn fosfátovým pufrem. Následně bylo proměřeno absorpční spektrum zředěného supernatantu. Koncentrace nasyceného roztoku inhibitorů ve fosfátovém pufru byla vypočtena podle vztahu:

$$c = \frac{A_{265}}{A_{265}(\mathrm{st})} c(\mathrm{st}) \cdot \text{ředění}, \qquad (5)$$

kde A_{265} je absorbance zředěného nasyceného roztoku sloučeniny ve fosfátovém pufru, A_{265}(st) je absorbance DMSO standardu 1000× zředěného fosfátovým pufrem, c(st) je koncentrace zředěného standardu a ředění značí ředící faktor nasyceného roztoku sloučeniny. Pro výpočet byla zvolena vlnová délka 265 nm, kde již neabsorbuje DMSO přítomný ve standardu. Absorpční spektra byla naměřena pomocí spektrofotometru UV-180 s Peltierovým termostatem S-1700, Shimadzu, měření probíhalo v křemenných kyvetách.

5.3.2 Nativní elektroforéza

Efekt inhibitorů na vazbu DBD FOXO3 na DNA byl sledován pomocí nativní elektroforézy v 12% polyakrylamidovém gelu, složení gelu viz tab. 10.24 v příloze, str. 109. Při nativní elektroforéze si proteiny zachovávají svou nativní konformaci a putují prostředím gelu v závislosti na svém náboji a velikosti. Pro nativní elektroforézu byl použit 1× koncentrovaný TBE pufr o pH 8,3, složení 10× koncentrovaného pufru viz tab. 10.25 v příloze, str. 109. pI DBD FOXO3 je 10,24, při pH 8,3 má kladný náboj, putuje ke katodě a nevstupuje do gelu. Do gelu vstupuje pouze komplex DBD FOXO3 s DNA, která mu propůjčuje záporný náboj, a volná DNA.

Vzorky pro nativní elektroforézu byly pipetovány na ledu vždy v pořadí: 20mM fosfátový pufr o pH 6,5 (složení viz tab. 10.22 v příloze, str. 108), roztok inhibitoru (výsledné koncentrace viz kapitola 6.2.4, str. 71, a obr. 6.13, str. 72), roztok $MgCl_2$ (o výsledné koncentraci 1,6mM), DBD FOXO3 (o výsledné koncentraci 5μM). Následovala 20 minutová inkubace na ledu. Poté byla přidána DNA s IRE motivem (o výsledné koncentraci 3μM), viz Příprava dvojvláknové DNA z oligonukleotidů níže, a po pěti minutové inkubaci byl přidán vzorkový pufr obsahující bromfenolovou modř, složení vzorkového pufru viz tab. 10.23 v příloze, str. 109. Na gel bylo pipetováno vždy 5 μl vzorku. Nativní elektroforéza probíhala na ledu při napětí 150 V po dobu 1,5 hodiny.

Gely byly vizualizovány pomocí fluorescenčního barviva GelRed®, které se váže na nukleové kyseliny. Do 100 ml deionizované vody bylo přidáno 10 μl 10 000x koncentrované GelRed®. Gely byly inkubovány v barvícím roztoku za tmy po dobu pěti minut, poté byly opláchnuty deionizovanou vodou a vyfoceny pomocí přístroje Fusion Solo S od firmy Vilber Lourmat. Snímky byly pořízeny po 700ms excitaci zářením s vlnovou délkou 312 nm.

Příprava dvojvláknové DNA z oligonukleotidů: Pro sledování vlivu inhibitorů na tvorbu komplexu DBD FOXO3 s DNA byla využita krátká DNA sekvence se 17 páry bází obsahující IRE motiv (viz kapitola 2.5, str. 26) – 5´-GACTATCAAAACAACGC-3´ (IRE motiv je podtržen). Krátká dvouvláknová DNA byla připravena ze dvou jednovláknových oligonukleotidových sekvencí, IRE-up a IRE-down od firmy Generi Biotech, s.r.o.

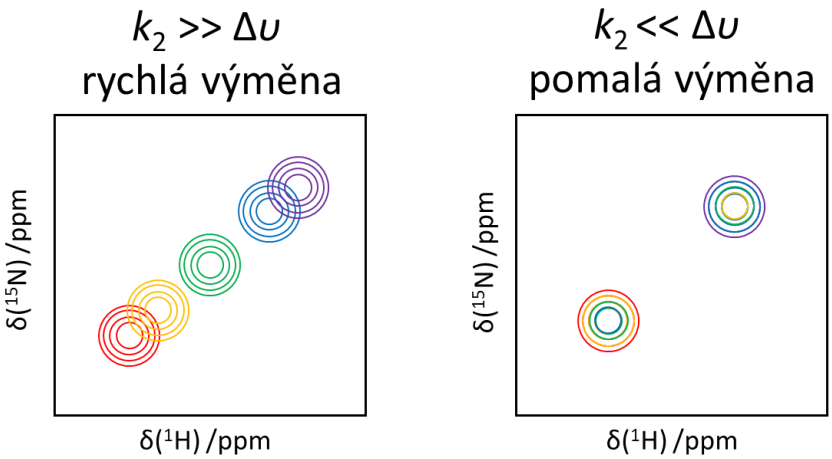
Oligonukleotidy byly zředěny deionizovanou vodou na výslednou koncentraci 1mM podle pokynů výrobce. Pro přípravu 0,5mM zásobního roztoku dvouvláknové DNA bylo pipetováno 50 µl 1mM IRE-up, 50 µl IRE down a 1 µl 3M roztoku NaCl. Směs byla řádně promíchána a poté byla na suchém ohřívači zahřívána na teplotu 70 °C po dobu pěti minut. Na závěr byl roztok ponechán vychladnout na pokojovou teplotu po dobu 20 minut a byl uchován při −20 °C.

5.3.3 Využití změn chemického posunu, CSP, pro mapování vazby ligandu

Perturbance chemického posunu, CSP, vyjadřuje změny chemických posunů NMR aktivních jader v molekule proteinu indukované vazbou ligandu. Umožňuje tak určit vazebné místo a případně i afinitu ligandu. Jednou z nejběžnějších metod sledování změn chemických posunů molekuly proteinu je měření ^{1}H-^{15}N HSQC spekter. Reversibilní vazba proteinu a ligandu je popsána rovnicí

$$\mathrm{P} + \mathrm{L} \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} [\mathrm{PL}], \tag{6}$$

kde k_1 je rychlostní konstanta asociace a k_2 rychlostní konstanta disociace. Rychlost disociace má vliv na vzhled spektra, viz obr. 5.21, str. 58. Je-li rychlostní konstanta disociace k_2 výrazně nižší než rozdíl rezonančních frekvení volné a navázané formy v Hz, pozorujeme tzv. pomalou výměnu. Při titraci ligandem dochází ve spektru k postupnému snižování intenzity signálu odpovídajícímu volné formě v roztoku a nárůstu intenzity signálu odpovídajícímu komplexu protein-ligand. Je-li k_2 výrazně vyšší než rozdíl rezonančních frekvencí v Hz, pozorujeme tzv. rychlou výměnu. Pozice píku ve spektru je váženým průměrem volné a vázané formy, viz obr. 5.21, str. 58. Mezním případem je tzv. středně rychlá výměna, kdy pro disociační konstantu platí $k_2 \sim \Delta\upsilon$. Ve spektru dochází k postupnému rozšiřování píku s rostoucí koncentrací ligandu, až k jeho úplné ztrátě. U ligandů s K_d vyšší než cca 3µM pozorujeme rychlou výměnu [91].



Obr. 5. 21 Pomalá a rychlá výměna. Vlevo rychlá výměna. Disociační konstanta je mnohem vyšší než rozdíl rezonančních frekvencí volné a navázané formy. Při titraci ligandem pozorujeme posun píku od volné formy k navázané formě, chemický posun je váženým průměrem volné a navázané složky. Vpravo pomalá výměna. Disociační konstanta je mnohem nižší než rozdíl rezonančních frekvencí volné a vázané formy. Při titraci ligandem ve spektru postupně klesá intenzita píku, který přísluší volné formě, a roste intenzita píku, který přísluší navázané formě. Převzato a upraveno z [91].

Chemické posuny jader ^{1}H a ^{15}N jsou různě citlivé na změny ve svém chemickém okolí. Rozdíly chemického posunu jader ^{15}N se proto násobí vážícím faktorem. Změna chemického posunu, CSP, byla vypočtena podle vztahu:

$$\mathrm{CSP} = \sqrt{\left[\Delta\delta_{\mathrm{H}}^2 + (\tfrac{1}{5}\Delta\delta_{\mathrm{N}})^2\right]}, \qquad (7)$$

kde $\Delta\delta_{\mathrm{H}}$ a $\Delta\delta_{\mathrm{N}}$ jsou změny chemického posunu vodíku a dusíku [91].

Vyhodnocení spekter bylo provedeno v programu Sparky 3.133 [75]. Jako signifikantní byly vzaty posuny s CSP větší, než střední hodnota CSP + σ_{cor}. Hodnota σ_{cor} byla získána následující procedurou – byla vypočtena střední hodnota CSP a její směrodatná odchylka, σ, následně byly vyloučeny residua s hodnotou CSP vyšší než střední hodnota CSP + 3σ. Byla vypočtena nová střední hodnota a směrodatná odchylka, postup byl opakován, dokud nebyly všechny hodnoty CSP nižší, než střední hodnota CSP + 3σ. Střední odchylka tohoto souboru je σ_{cor} [92].

Disociační konstantu lze získat sledováním CSP jedné aminokyseliny v závislosti na koncentraci inhibitoru a platí pro ni vztah:

$$\mathrm{CSP} = \mathrm{CSP}_{\mathrm{max}}\{([\mathrm{P}]_0 + [\mathrm{L}]_0 + K_{\mathrm{d}}) - [([\mathrm{P}]_0 + [\mathrm{L}]_0 + K_{\mathrm{d}})^2 - 4[\mathrm{P}]_0[\mathrm{L}]_0]^{1/2}\}/2[\mathrm{P}]_0, \quad (8)$$

kde $[\mathrm{P}]_0$ je celková koncentrace proteinu a $[\mathrm{L}]_0$ je celková koncentrace ligandu, K_{d} je disociační konstanta a $\mathrm{CSP}_{\mathrm{max}}$ je změna maximální chemického posunu v saturaci [91].

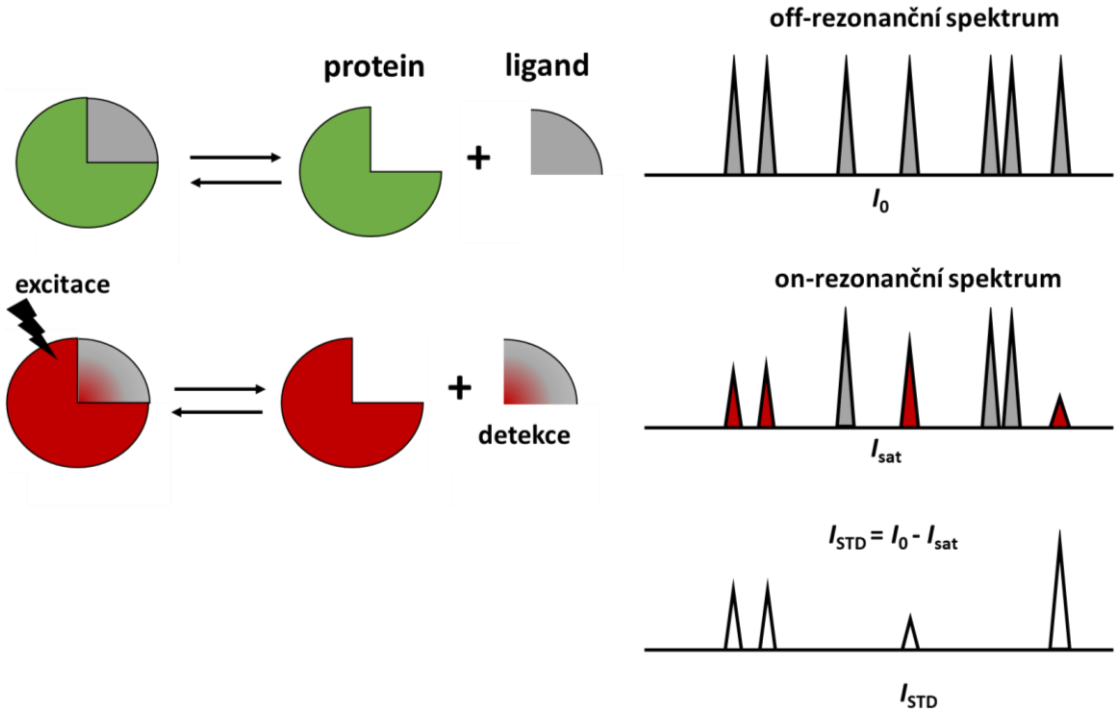
Příprava vzorku: Pro studium vazby inhibitorů na DBD FOXO3 pomocí ^{1}H-^{15}N HSQC experimentu byla připravena sada vzorků 100μM proteinu a inhibitoru o příslušné koncentraci, viz Tab 5.1 a 5.2, str. 54 a 55. Pro přípravu vzorků byl použit 20mM fosfátový pufr o pH 6,5 viz tab 10.22, str. 108, popř. 100mM fosfátový pufr o pH 6,5, složení viz tab. 10.27 v příloze, str. 109. Vzorek obsahoval 10% $^{2}H_2O$. Objem vzorků byl 350 μl, měření probíhalo v Shigemi kyvetách při teplotě 25 °C. Spektra byla získána pomocí 850MHz (Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, v.v.i.) a 600MHz (Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy) Bruker Avance III spektrometru.

5.3.4 STD experiment

STD (z angl. saturation transfer difference) NMR experiment představuje další techniku sledování interakcí molekuly proteinu s ligandem. V tomto případě jsou v 1D ^{1}H NMR spektru sledovány signály ligandu. Protony ligandu, které se účastní interakce s proteinem, mají v STD spektru signál. STD experiment je založen na přenosu saturace z molekuly proteinu na navázanou molekulu ligandu prostřednictvím nukleárního Overhauserova efektu, viz kapitola 5.2.4, str. 51, lze ho využít pro detekci vazby ligandu s disociační konstantou řádově 10^{-2}–10^{-8} [93].

Prvním krokem STD experimentu je získání tzv. off-resonančního spektra. Selektivním ozařováním je saturována oblast, kde se nenachází signály proteinu ani ligandu, výsledkem je protonové spektrum s nezměněnými intenzitami, viz obr. 5.22, str. 60. Dalším krokem je získání tzv. on-resonančního spektra, kdy jsou selektivně excitována ^{1}H jádra proteinu. Při STD experimentech v této práci byla pomocí selektivního tvarovaného pulsu saturována oblast kolem −0,54 ppm. Saturace se přenáší molekulou proteinu prostřednictvím intramolekulárního NOE, následně je přenesena na protony ligandu v přímé blízkosti proteinu prostřednictvím intermolekulární ^{1}H-^{1}H NOE. Výsledkem je protonové spektrum s pozměněnými intenzitami signálů protonů, které se nachází v blízkosti molekuly proteinu. STD spektrum se získá jako rozdíl těchto dvou spekter, viz. obr. 5.22, str. 60 [93].

Vyhodnocení spekter bylo provedeno v programu TopSpin™ 3.6.1 od firmy Bruker.



Obr. 5.22 Princip STD experimentu. V prvním kroce je získáno off-rezonanční spektrum s nezměněnými intenzitami I_0, ozařována je oblast, kde se nenachází signály proteinu ani ligandu. Následně je selektivně saturována molekula proteinu. Prostřednictvím intermolekulárního NOE dojde k přenosu saturace na protony ligandu, které se nachází blízko povrchu proteinu. Jejich signály pak mají změněnou intenzitu v on-rezonančním spektru. Po odečtení on-rezonančního spektra od off-rezonančního dostaneme diferenční spektrum se signály protonů účastnících se interakce s proteinem. Převzato a upraveno z [93].

Příprava vzorku: Pro STD experiment byla připravena série vzorků s neznačenou DBD FOXO3 o koncentraci 15μ a 1mM inhibitorem. Tam, kde nebylo možné dosáhnout koncentrace 1mM, byla použitá koncentrace inhibitoru nejvyšší možná s ohledem na rozpustnost, viz tab. 5.1 a 5.2, str. 54 a 55. Měření probíhala v 20mM fosfátovém pufru o pH 6,5, s přídavkem 10% ^2H_2O při 25 °C, složení fosfátového pufru viz tab. 10.22 v příloze, str. 108. Všechna spektra byla získána pomocí 850MHz Bruker Avance III spektrometru (Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, v.v.i.).

5.3.5 Molekulové dokování

^1H-^{15}N HSQC experiment poskytuje informaci o tom, která část DBD FOXO3 tvoří vazebné místo pro jednotlivé inhibitory. Pomocí STD experimentu je možné identifikovat protony inhibitorů, které se nachází v přímé blízkosti povrchu proteinu. Pro doplnění informací získaných na základě NMR experimentů, tj. vyobrazení vazebné konfromace a případný odhad možných interakcí mezi molekulou proteinu a inhibitoru bylo použito

molekulové dokování.

Molekulové dokování je počítačové modelování interakce proteinu s ligandem. Cílem je získat vazebnou konformaci a případně odhad vazebné afinity. Dokování se skládá ze dvou procesů. Prvním z nich je prozkoumávání konformačního prostoru, kdy jsou generovány různé pozice ligandu na povrchu proteinu a různé vazebné konformace. Druhým procesem je skórování, kdy je pomocí tzv. skórovací funkce odhadnuta volná energie modelovaného systému. Pomocí skórovací funkce je identifikována termodynamicky nejpravděpodobnější konfigurace [94].

Při molekulovém dokování je molekula proteinu často brána jako rigidní. V této práci bylo provedeno tzv. flexibilní dokování, kdy jsou postranní řetězce vybraných aminokyselin volně rotovatelné. Na základě NMR dat bylo vybráno několik aminokyselin, jejichž postranní řetězce byly ponechány volně rotovatelné.

V této práci byl použit AutoDock Vina [95], který využívá stochastické prozkoumávání konformačního prostoru. Jeho skórovací funkce je empirická a zahrnuje pouze některé příspěvky potenciální energie systému (například Van der Waalsovy interakce a vodíkové můstky), vazebná energie je proto jen hrubým odhadem [95].

Vstupní soubory byly připraveny v programu AutoDock Tools 1.5.6 [96]. Vstupní soubory mají příponu .pdbqt, jedná se o rozšíření .pdb formátu o informaci o parciálních nábojích jednotlivých atomů a o jejich typu. Residua se signifikantní CSP, viz kapitola 5.3.3, str. 58, byla vybrána jako flexibilní dále byly jako flexibilní označeny aminokyseliny v jejich okolí, tak aby vznikl souvislý vazebný povrch. Pro každý inhibitor byly generovány dva soubory, jeden obsahující flexibilní část proteinu, jeden obsahující jeho rigidní část. Struktury inhibitorů byly připraveny v programu Maestro (Schrödinger Release 2018-2: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020) a příslušné pdbqt soubory byly generovány programem AutoDock Tools 1.5.6 [96]. Oblast, kde připadá v úvahu umístění ligandu a prohledávání konformačního prostoru byla v programu AutoDock Tools 1.5.6 [96] vymezena pomocí kvádru. Jeho střed a rozměry jsou součástí vstupních souborů.

6 Výsledky

6.1 Řešení struktury DBD FOXO1 pomocí NMR

Samotnému řešení struktury DBD FOXO1 pomocí NMR předcházela exprese a purifikace ^{13}C a ^{15}N značeného proteinu. Následovala příprava vzorku, nasnímání příslušných experimentů, viz tab. 6.1, str. 65, a přiřazení rezonancí. Na základě rezonančního přiřazení byla získána omezení pro výpočet struktury DBD FOXO1, který provedl Ing. Václav Veverka, Ph.D. (Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i.).

Kvalita nasnímaných spekter byla ovlivněna degradací C-konce DBD FOXO1. Spektra pro řešení struktury byla proto nasnímána na vzorcích proteinu ze třech nezávislých purifikací. Dále je uvedena jedna reprezentativní purifikace.

6.1.1 Exprese DBD FOXO1

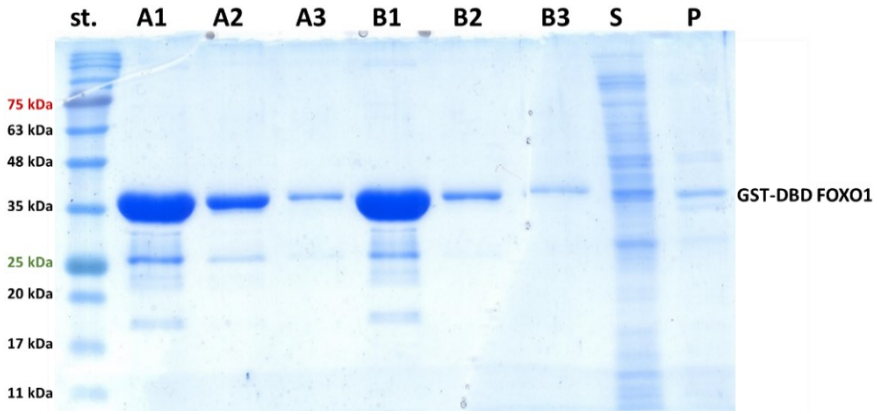
Exprese ^{13}C a ^{15}N značené DBD FOXO1 probíhala v buňkách *E. Coli*, kmen BL21(DE3), pěstovaných ve 4–8 litrech obohaceného minimálního média, viz. Exprese ^{15}N a ^{13}C značených proteinů, str. 38, po dobu 16–18 hodin při 20 °C. DBD Proteinu FOXO1 byla exprimována jako fúzní protein s GST afinitní kotvou na N-konci. Dále je uvedena purifikace DBD FOXO1 exprimované v šesti litrech obohaceného minimálního média.

6.1.2 Purifikace DBD FOXO1

Purifikace ^{13}C a ^{15}N značeného DBD FOXO1 se skládá z několika hlavních kroků, jimiž jsou GST afinitní chromatografie, dialýza a odštěpení GST kotvy a gelová permeační chromatografie. Lyze buněk byla provedena podle postupu uvedeném v oddíle Lyze buněk, str. 38, celkový čas působení ultrazvukového pulzu byl 16 minut.

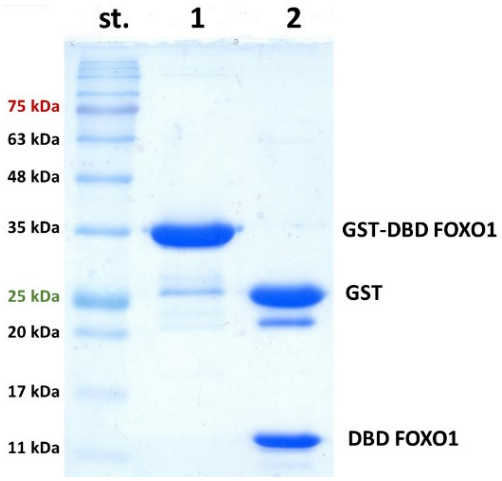
GST afinitní chromatografie: Byly provedeny dvě paralelní GST chromatografie na dvou kolonách s 5 ml GST sefarózy. Eluce byla provedena nadbytkem glutathionu, elační pufr viz tab. 10.12 v příloze, str. 107. Jímáno bylo 2×6 frakcí po 10 ml, postup viz GST afinitní chromatografie, str. 39. Vybrané frakce byly analyzovány pomocí 15% SDS-PAGE, výsledný gel je uveden na obr. 6.1, str. 63. Z gelu je patrné, že pomocí GST afinitní chromatografie, která je specifická, byl získán protein GST-DBD FOXO1 o poměrně značné čistotě. Po GST afinitní chromatografii byly sloučeny frakce A1–A2 a B1–B2.

Měřením absorbance byl odhadnut výtěžek proteinu GST-DBD FOXO1 na 30 mg, výtěžek byl vypočten podle vztahu (2), str. 42.



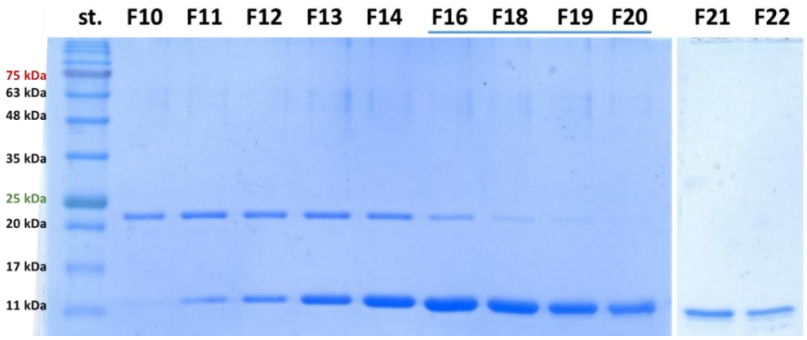
Obr. 6.1 Ověření čistoty frakcí po GST chromatografii pomocí 15% SDS-PAGE. V první dráze gelu je standard molekulových vah, označený st., pro tento účel byl použit Blue Protein Ladder (Biosystems). Frakce A1–A3 a B1–B3 jsou frakce 1–3 jímány na jednotlivých kolonách. V dráze s označením S je zředěný buněčný lyzát, v dráze s označením P je zředěná buněčná frakce.

Dialýza a odštěpení GST kotvy: Pro dialýzu byla použita membrána propustná pro molekuly s molekulovou hmotností do 6–8 kDa. Dialýza probíhala při 4 °C přes noc v pufru, jehož složení je uvedeno v tab. 10.13 v příloze, str. 107. Pro úplné odštěpení GST afinitní kotvy bylo k roztoku proteinu přidáno 300 U PreScission proteasy (10 U na 1 mg štěpeného proteinu). Po vyjmutí z dialýzy byla kvalita štěpení analyzována pomocí 15% SDS-PAGE, výsledný gel je uveden na obr. 6.2. Z gelu je patrné, že odštěpení GST afinitní kotvy proběhlo kvantitativně.

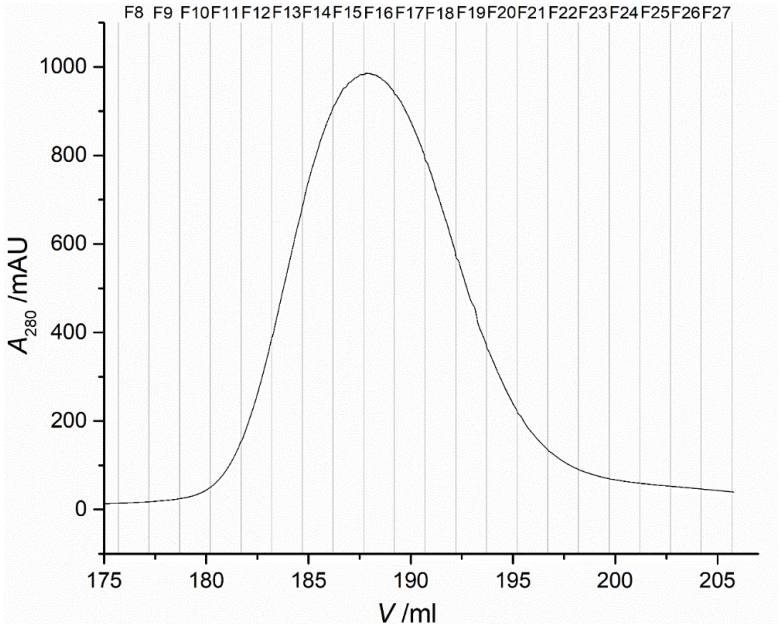


Obr. 6.2 Ověření odštěpení GST kotvy pomocí 15% SDS-PAGE. V první dráze gelu je standard molekulových vah, označený st., pro tento účel byl použit Blue Protein Ladder (Biosystems). V dráze označené číslem 1 je vzorek odebraný před štěpením, v dráze označené číslem 2 je vzorek odebraný po štěpení GST afinitní kotvy.

Gelová permeační chromatografie: Gelová permeační chromatografie byla provedena dle postupu uvedeném v oddíle Gelová permeační chromatografie, str. 40. Objem roztoku proteinu dávkovaný na kolonu byl 1,7 ml. Jako mobilní fáze byl použit Tris-HCl pufr, jehož složení je uvedeno v tab. 10.14 v příloze, str. 107. Pro chromatografii byla použita kolona HiLoad™ 26/600 Superdex™ 75 pg s rychlostí průtoku mobilní fáze 1,5 ml/min. Eluční profil DBD FOXO1 je uveden na obr. 6.4. Čistota frakcí F10–F22 byla analyzována pomocí 15% SDS-PAGE, výsledný gel je uveden na obr. 6.3. Sloučeny byly frakce F16–F20. Výtěžek purifikace byl vypočten dle vztahu (2), str. 42, a činil 1,9 mg. ^{13}C a ^{15}N izotopově značená DBD FOXO1 tak byla připravena v dostatečném množství a čistotě pro NMR experimenty.



Obr. 6.3 Kontrola čistoty frakcí pomocí 15% SDS-PAGE. V první dráze gelu je standard molekulových vah, označený st., pro tento účel byl použit Blue Protein Ladder (Biosystems). V ostatních drahách jsou příslušné frakce. Sloučené frakce použité pro NMR experimenty jsou podtženy modře.



Obr. 6.4 Eluční profil DBD FOXO1. Na obrázku je graf závislosti absorbance při 280 nm na objemu mobilní fáze. Svislými čarami jsou vyznačeny jednotlivé frakce.

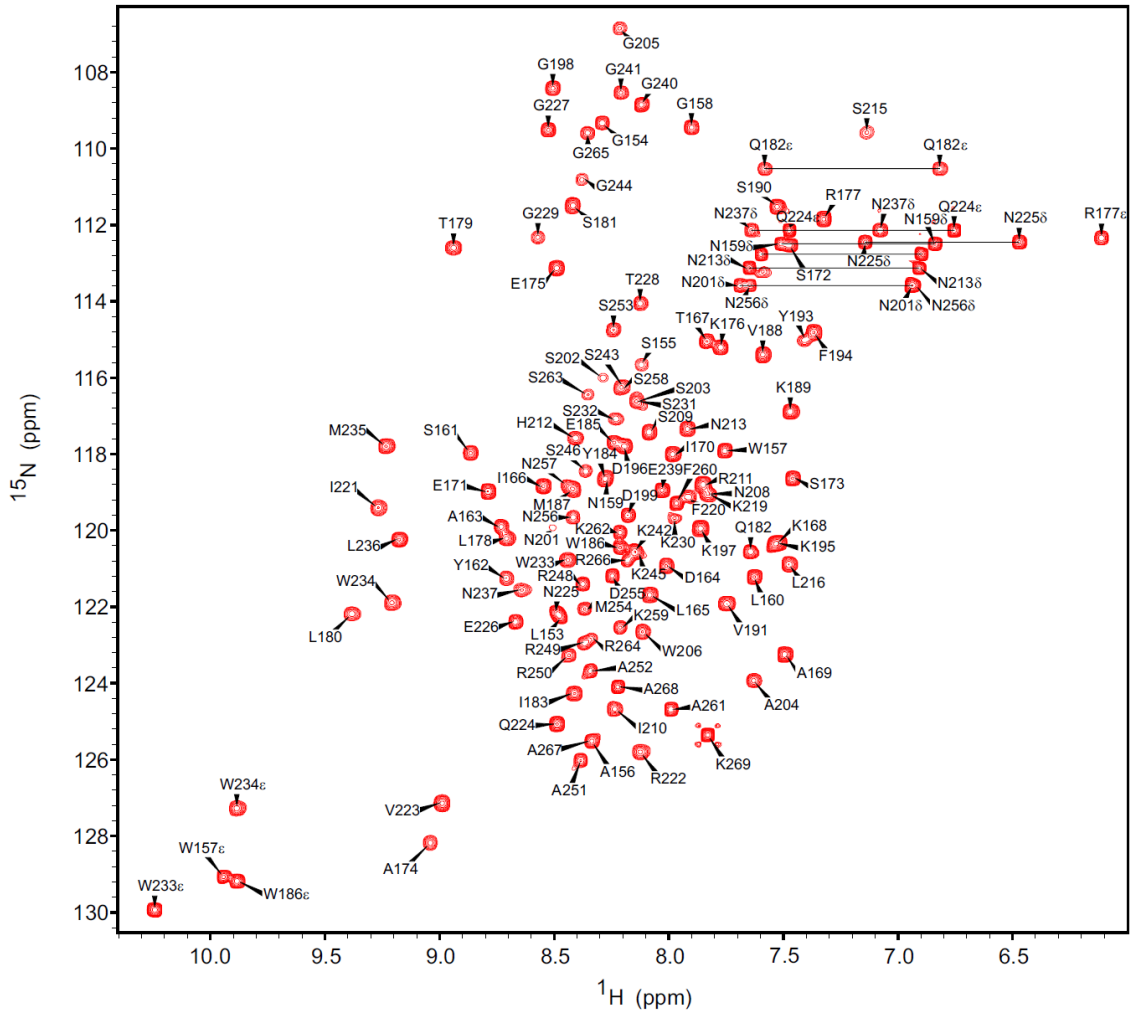
6.1.3 NMR experimenty

Za účelem vyřešení struktury DBD FOXO1 bylo provedeno několik 2D a 3D NMR experimentů. NMR experimenty byly naměřeny při 25 °C pomocí 600MHz (Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy) a 850MHz (Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i.) spektrometru Bruker Avance III, jejich přehled je uveden v tab. 6.1.

Tab. 6.1 Provedené NMR experimenty

Experiment	Spektrometr
2D ^{1}H-^{15}N HSQC	600 MHz
2D ^{1}H-^{13}C HMQC	600 MHz
3D HNCO	600 MHz
3D HN(CA)CO	600 MHz
3D HNCACB	600 MHz
3D CBCA(CO)NH	600 MHz
3D HBHA(CO)NH	600 MHz
3D CC(CO)NH	600 MHz
3D HCCH-TOCSY	850 MHz
3D ^{1}H-^{15}N NOESY-HSQC	850 MHz
3D ^{1}H-^{13}C HMQC-NOESY	850 MHz

Pomocí 3D experimentů bylo v ^{1}H-^{15}N HSQC spektru přiřazeno 104 ze 111 (94 %) N-H skupin peptidové vazby, viz obr. 6.5, str. 66. Dále byly přiřazeny některé rezonance N-H skupin postranních řetězců. V ^{1}H-^{15}N NOESY-HSQC a ^{1}H-^{13}C HMQC-NOESY spektrech bylo přiřazeno 3006 z 3139 píků. Vyhodnocením jejich intensit bylo získáno 1712 ^{1}H-^{1}H vzdálenostních omezení pro výpočet struktury. Vzdálenostní omezení byla doplněna o omezení torzních úhlů získané na základě chemických posunů. Omezení pro výpočet struktury jsou shrnuta v tabulce 6.2, str. 66. Rezonanční přiřazení bylo zaneseno do BMRB (z angl. Biological Magnetic Resonance Data Bank) pod kódem 34364 dne 3. 5. 2019.



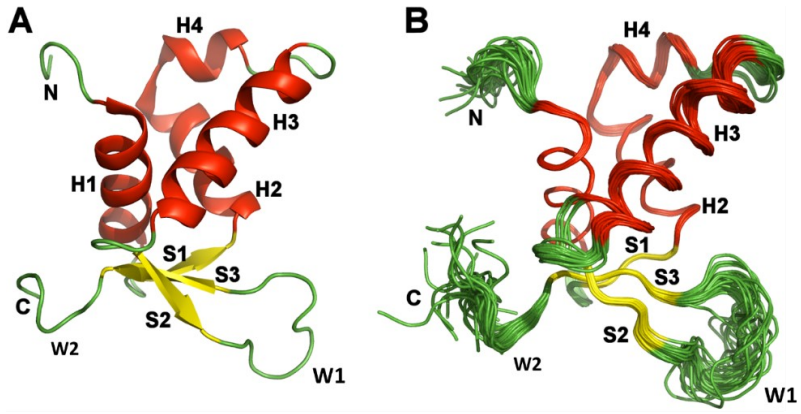
Obr. 6.5 ^{1}H-^{15}N HSQC spektrum DBD FOXO1. Ve spektru je přiřazeno 104 ze 111 N-H skupin peptidové vazby a některé N-H skupiny postranních řetězců [54].

Tab. 6.2 Omezení pro výpočet struktury získaná na základě NMR dat

Omezení pro výpočet struktury	
Celkový počet NOE omezení	1712
NOE na krátké vzdálenosti	
Intra-residuální (i = j)	445
sekvenční (| i - j | = 1)	402
NOE středního dosahu (1 < | i - j | < 5)	325
NOE na dlouhé vzdálenosti (| i - j | ≥ 5)	530
Torzní úhly	128
Vodíkové vazby	-
Celkový počet omezení	1840
Celkový počet omezení na 1 aminokyselinu	16.3

6.1.4. Struktura DBD FOXO1

Struktura DBD FOXO1 má charakteristický winged-helix motiv forkhead DBD, viz kapitola 2.4, str. 25. Podobně jako FOXO3 a FOXO4 má FOXO1 krátký 3_{10}-helix H4 mezi α-helixy H2 a H3. Struktura helixů H1, H2, H4, C-koncová část α-helixu H3 a struktura β-listů je jasně definována se střední kvadratickou odchylkou, R.M.S.D., C_α atomů menší než 1 Å. Konformačně heterogenní je oblast N a C-konce, N-koncová část α-helixu H3, oblast mezi H3 a S2 a oblast smyček W1 a W2. Jedná se často o oblasti odpovědné za interakci s DNA, viz kapitola 2.5, str. 26. Struktura DBD FOXO1 byla zanesena do PDB (z angl. Protein Data Bank) pod kódem 6QVW. Validační zpráva o získané struktuře je přiložena v příloze, str. 120–148. Struktura DBD FOXO1 byla porovnána se známými strukturami DBD FOXO3 a FOXO4, strukturní rozdíly jsou popsány v diskuzi, str. 87, a publikaci "Forkhead Domains of FOXO Transcription Factors Differ in both Overall Conformation and Dynamics", která je přiložena v příloze, str. 149–163.



Obr. 6.6 Struktura DBD FOXO1. A Reprezentativní konformace. Zobrazená jsou residua 156-243. **B** 30 superimponovaných konformerů souboru NMR struktur. Elementy sekundární struktury jsou odlišeny barevně. Červeně jsou vyznačeny α-helixy, žlutě jsou vyznačeny β-listy, zeleně nestrukturované oblasti. Převzato z [54].

6.2 Studium a charakterizace inhibitorů interakce FOXO3 s DNA

6.2.1 Exprese DBD FOXO3

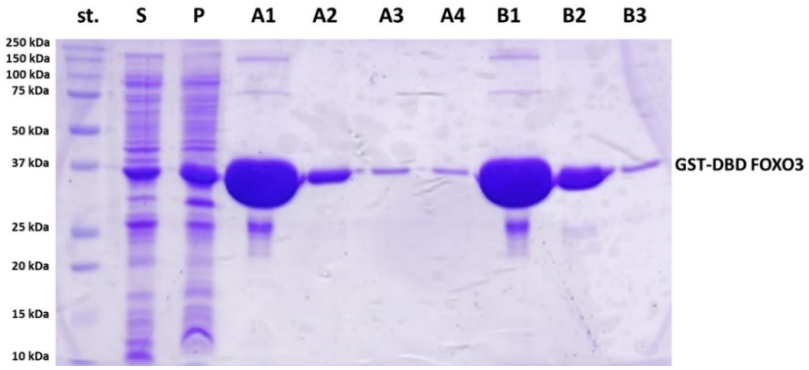
Exprese neznačené a ^{15}N značené DBD FOXO3 probíhala v buňkách *E. Coli*, kmen BL21(DE3), pěstovaných v 6–12 litrech živného média, viz kapitola 5.1.1, str. 37, po dobu

16–18 hodin při 20 °C. DBD FOXO3 byla exprimována jako fúzní protein s GST afinitní kotvou na N-konci.

6.2.2 Purifikace DBD FOXO3

Podobně jako purifikace DBD FOXO1 zahrnuje purifikace DBD FOXO3 tři hlavní kroky, a to GST afinitní chromatografii, odštěpení GST kotvy a gelovou permeační chromatografii. Lyze buněk probíhala podle postupu uvedeném v oddíle Lyze buněk, str. 38. Dále je uvedena purifikace ^{15}N značené DBD proteinu FOXO3 exprimovaného v 8 l minimálního média, a stručný výsledek purifikace neznačeného proteinu exprimovaném v 6 l LB média.

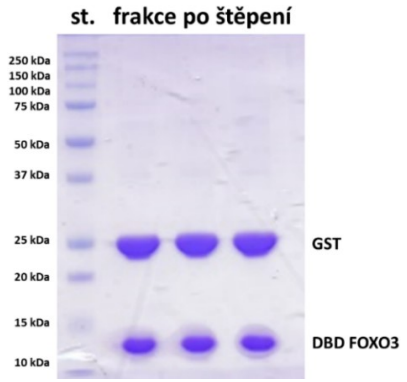
GST afinitní chromatografie: GST chromatografie byla provedena podle postupu uvedeném v oddíle GST afinitní chromatografie, str. 39. Byly použity 2 plastové kolony s 5 ml GST sefarózy, tj. 1 kolona na protein exprimovaný ve 4 l minimálního média. Jímáno bylo 2×6 frakcí. Vybrané frakce byly analyzovány pomocí 15% SDS-PAGE. Výsledný gel je uveden na obr. 6.7. Z gelu je patrné, že po GST afinitní chromatografii byl získán protein o značné čistotě a množství. Sloučeny byly frakce A1–A3 a B1–B3. Výtěžek proteinu GST-DBD FOXO3 byl odhadnut pomocí měření absorbance při 280 nm a vypočten dle vztahu (2), str. 42, činil 179 mg.



Obr. 6.7 Kontrola čistoty frakcí po GST chromatografii pomocí 15% SDS-PAGE. V první dráze gelu je standard molekulových vah, označený st., pro tento účel byl použit Precision Plus ProteinTM Dual Color Standard (Bio-Rad). Frakce A1–A4 a B1–B3 jsou frakce jímané na jednotlivých kolonách. V dráze s označením S je zředěný buněčný lyzát, v dráze s označením P je zředěná buněčná frakce.

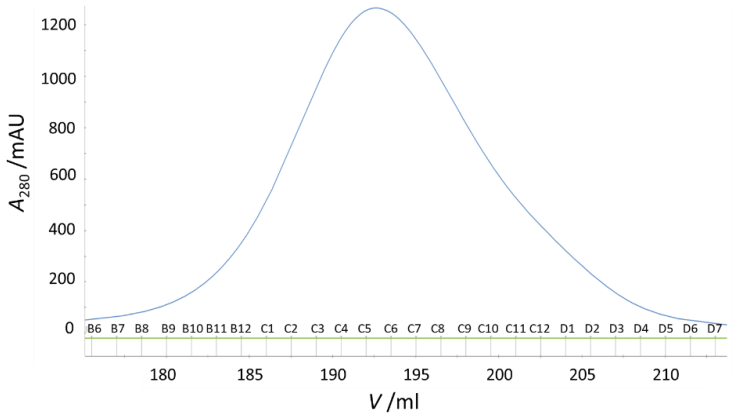
Odštěpení GST afinitní kotvy: Pro úplné odštěpení GST afinitní kotvy bylo přidáno 1800 U PreScission proteasy. Po vyjmutí z dialýzy byla kvalita odštěpení GST kotvy

analyzována pomocí 15% SDS-PAGE. Výsledný gel je uveden na obr. 6.8. Z gelu je patrné, že odštěpení GST kotvy proběhlo kvantitativně.

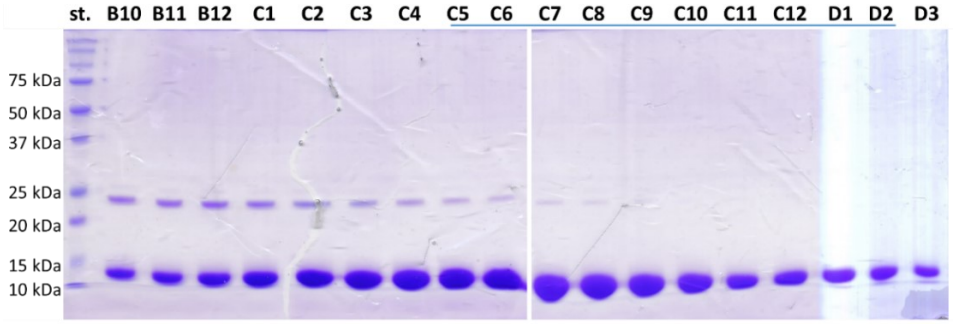


Obr. 6.8 Ověření odštěpení GST kotvy pomocí 15% SDS-PAGE. V první dráze gelu je standard molekulových vah, označený st., pro tento účel byl použit Precision Plus ProteinTM Dual Color Standard (Bio-Rad). Ve zbytku drah jsou frakce odebrané před štěpením GST kotvy.

Gelová permeační chromatografie: Gelová permeační chromatografie byla provedena dle postupu uvedeném v oddíle Gelová permeační chromatografie, str. 40. Objem roztoku proteinu dávkovaný na kolonu byl 1,7 ml. Jako mobilní fáze byl použit pufr, jehož složení je uvedeno v tab. 10.14 v příloze, str. 107. Pro chromatografii byla použita kolona HiLoad™ 26/600 Superdex™ 75 pg s rychlostí průtoku mobilní fáze 1,5 ml/min. Eluční profil DBD FOXO3 je uveden na obr. 6.9. Čistota frakcí B10–D3 byla analyzována pomocí 15% SDS-PAGE, výsledný gel je uveden na obr. 6.10, str. 70. Sloučeny byly frakce C5–D2. Výtěžek purifikace byl vypočten dle vztahu (2), str. 42, a činil 20 mg. ^{15}N izotopově značená DBD FOXO3 byla připravena v dostatečném množství a čistotě pro NMR experimenty.

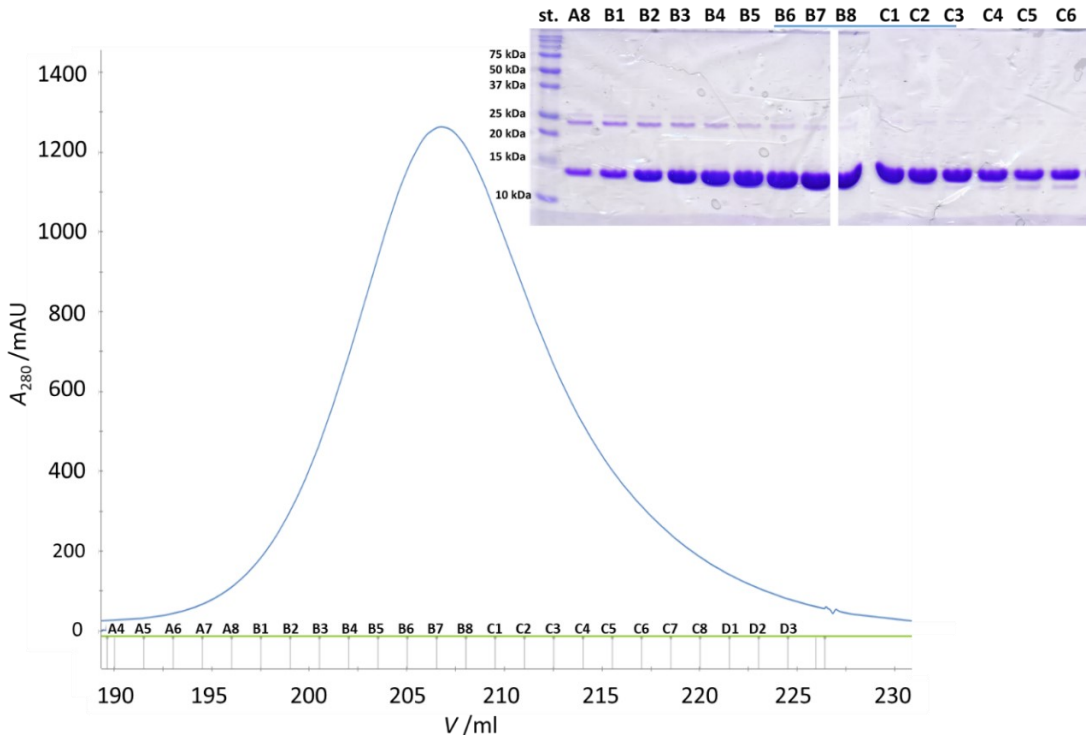


Obr. 6.9 Eluční profil DBD FOXO3 z gelové permeační chromatografie. Na obrázku je graf závislosti absorbance při 280 nm na objemu mobilní fáze. Jednotlivé frakce jsou vyznačeny na x-ové ose.



Obr. 6.10 Kontrola čistoty frakcí pomocí 15% SDS-PAGE. V první dráze gelu je standard molekulových vah, označený st., pro tento účel byl použit Precision Plus ProteinTM Dual Color Standard (Bio-Rad). V ostatních drahách jsou příslušné frakce. Sloučené frakce použité pro NMR experimenty jsou podtrženy modře.

Purifikace neznačeného DBD FOXO3: Při purifikaci neznačené DBD FOXO3 bylo postupováno analogicky jako při purifikaci značeného proteinu. Dále je ve stručné formě uveden výsledek purifikace neznačeného proteinu exprimovaného v 6 l LB média, viz obr.6.11. Výtěžek purifikace byl určen podle vztahu (2), str. 42, a činil 15 mg. Neznačená DBD FOXO3 byla připravena v dostatečném množství a čistotě pro experimenty provedené v této práci.



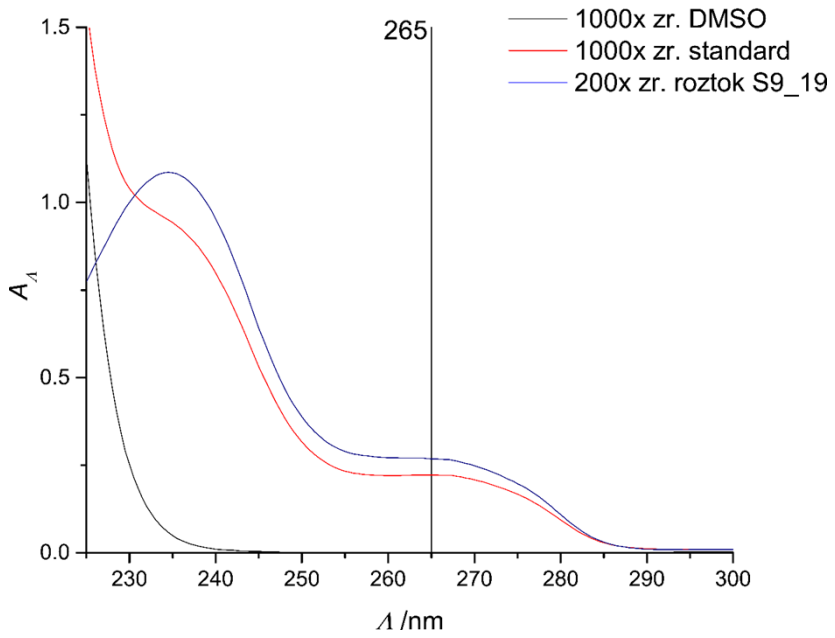
Obr. 6.11 Eluční profil neznačené DBD FOXO3 z gelové permeační chromatografie (exprimované v 6 l LB média). V dolní části obrázku je eluční profil, graf závislosti absorbance při 280 nm na objemu mobilní fáze. V pravé horní části je kontrola čistoty frakcí pomocí 15% SDS-PAGE. Sloučené frakce jsou podtrženy modře. Jako standard molekulových vah byl použit Precision Plus ProteinTM Dual Color Standard (Bio-Rad).

6.2.3 Odhad koncentrace nasycených roztoků inhibitorů

Koncentrace nasycených roztoků inhibitorů v 20mM fosfátovém pufru o pH 6,5, složení viz tab. 10.22 v příloze, str. 28, byla odhadnuta pomocí vztahu (5), str. 55. Dále je uveden příklad výpočtu koncentrace nasyceného roztoku sloučeniny S9_19.

$$c = \frac{0{,}268}{0{,}222} \cdot 50 \cdot 10^{-6} \cdot 200 = 12 \text{ mmol dm}^{-3}$$

Absorpční spektra sloučeniny S9_19 jsou uvedena na obr. 6.12. Pro výpočet byla použita vlnová délka 265 nm, kde neabsorbuje DMSO přítomný ve standardu. Ostatní výsledky jsou uvedeny v tab. 5.1, str. 54, a tab. 5.2, str. 55.

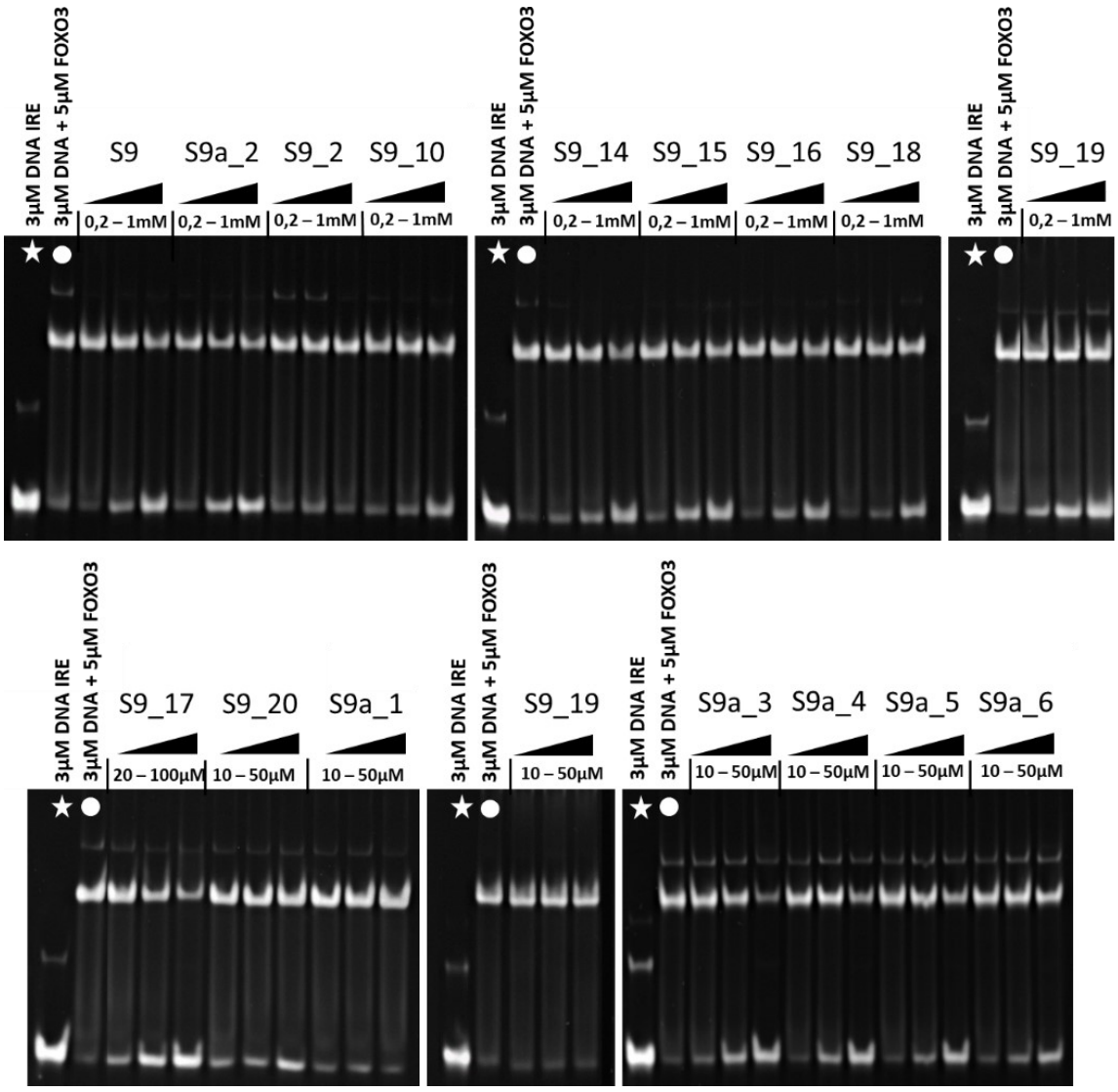


Obr. 6.12 Absorpční spektra sloučeniny S9_19. Černě je vyznačeno absorpční spektrum DMSO 1000× zředěného ve fosfátovém pufru, složení viz tab. 10.22 v příloze, str. 108, červěně je uvedeno spektrum 1000× zředěného standardního roztoku o koncentraci sl. S9_19 50μM. Modré spektrum je absorpční spektrum 200× zředěného nasyceného roztoku sloučeniny ve fosfátovém pufru. Obrázek byl vyroben v programu OriginPro, v. 9, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.

6.2.4 Nativní elektroforéza

Podle postupu uvedeném v kapitole 5.3.2, str. 56, byly připraveny vzorky pro nativní elektroforézu. Koncentrace DNA s IRE motivem byla vždy 3μM, koncentrace DBD FOXO3 5μM a koncentrace jednotlivých inhibitorů byly 0,2; 0,4 a 1mM v případě rozpustnějších sloučenin a 10, 20 a 50μM v případě méně rozpustných sloučenin (výjimkou je sl. S9_17, jejíž koncentrace byly 20, 40 a 100μM). Na gel bylo naneseno vždy 5 μl

vzorku. Gely byly vizualizovány pomocí fluorescenční barvy GelRed®, vážící se na DNA podle postupu uvedeném v kapitole 5.3.2, str.56. Výsledné gely jsou uvedeny na obr. 6.13.



Obr. 6.13 Nativní 12%PAGE zobrazující interakci FOXO3 s DNA. Na gelech jsou tří bodové titrace jednotlivých inhibitorů. Rozsah koncentrací inhibitorů je zapsán nad příslušnými dráhami. Koncentrace DNA je vždy 3µM a koncentrace proteinu je vždy 5µM. Hvězdičkou je označena kontrola, kde je přítomna pouze DNA s IRE motivem, viz oddíl Příprava dvojvláknové DNA z oligonukleotidů, str. 57. Kolečkem je označena kontrola s komplexem DNA:DBD FOXO3 v poměru 3:5 v nepřítomnosti inhibitorů.

Gely poskytují srovnání nově syntetizovaných inhibitorů s původní sloučeninou S9. Při vyšších koncentracích inhibitorů je patrný inhibiční efekt u většiny z nich, ten je zde srovnatelný s inhibičním efektem sloučeniny S9. U méně rozpustných inhibitorů je patrný inhibiční efekt už při nižších koncentracích, tj. 20–50µM. Při takto nízkých koncentracích inhibiční efekt sloučeniny S9 pozorovat nelze (na gelu je 200–1000µM sloučenina S9).

Tento fakt nasvědčuje, že sloučeniny S9_17, S9_20 a inhibitory řady S9a mají lepší schopnost inhibovat vazbu DBD FOXO3 na DNA než původní sloučenina S9.

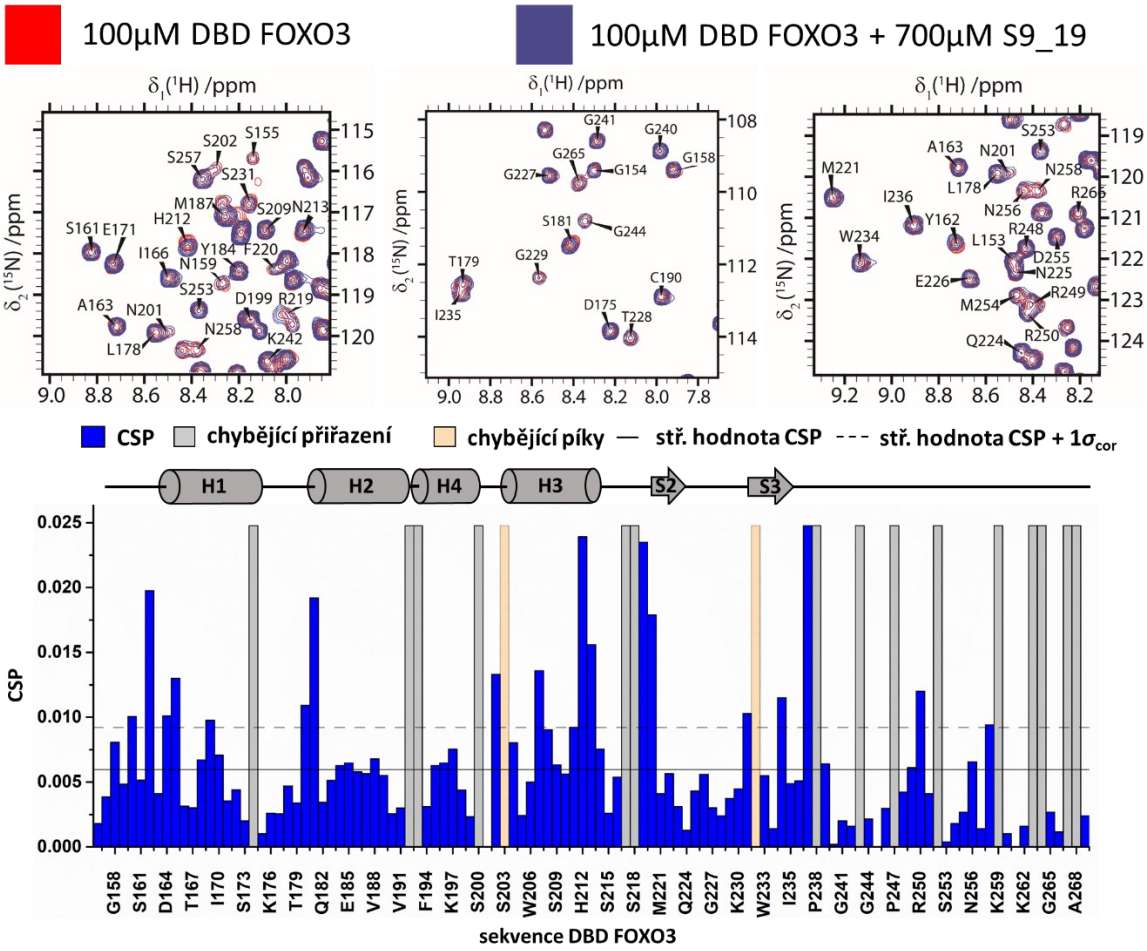
6.2.5 Studium interakce derivátů sloučeniny S9 s DBD FOXO3

S pomocí nativní elektroforézy bylo ukázáno, že všechny deriváty původní sloučeniny S9 jsou do určité míry schopny inhibovat interakci DBD FOXO3 s DNA s IRE motivem. Pro ověření přímé interakce sloučenin s DBD FOXO3 a informaci o interagujících skupinách těchto sloučenin byla provedena série ^{1}H STD NMR experimentů. Koncentrace proteinu byla vždy 15μM, koncentrace inhibitorů 1mM (0,2mM v případě sl. S9_17), viz tab. 5.1, str. 54, a 5.2, str. 55. Měření probíhalo v 20mM fosfátovém pufru o pH 6,5, složení viz tab. 10.22 v příloze, str. 108, s přídavkem 10% $^{2}H_2O$. Pro některé sloučeniny se vzhledem k jejich nízké rozpustnosti v použitém pufru STD experiment nepovedlo provést. Výsledná STD spektra jsou uvedena v příloze, str. 115–119, a ukazují, že všechny dostatečně rozpustné deriváty sloučeniny S9 interagují s DBD FOXO3. Paralelně s těmito experimenty byla u všech připravených derivátů testována jejich schopnost inhibovat transkripční program FOXO3 v tkáňových kulturách buněk lidského neuroblastomu. Tyto experimenty, které byly provedeny v laboratoři prof. M. J. Ausserlechnera (Department of Pediatrics I, Medizinische Universität, Innsbruck, Rakousko), ukázaly, že pouze látky S9_19, S9_20, S9a_4 a S9a_6 vykazují výrazně lepší inhibiční aktivitu v porovnání s původní sloučeninou S9. Proto byla detailní charakterizace interakcí s DBD FOXO3 provedena pouze u těchto sloučenin. Předběžné experimenty ukázaly, že látky S9_20 a S9a_6 i při koncentracích nižších než 0,5mM výrazně ovlivňují pH 20mM fosfátového pufru o pH 6,5, což znemožňuje přesnou interpretaci posunů v ^{1}H-^{15}N HSQC spektrech. Proto byla ^{1}H-^{15}N HSQC spektra těchto sloučenin naměřena i v koncentrovanějším 100mM fosfátovém pufru o pH 6,5, složení viz tab. 10.27 v příloze, str. 109. Vzhledem k rozpustnosti těchto čtyř sloučenin sloučenin byl STD experiment naměřen pouze se sloučeninou S9_19.

6.2.6 Identifikace vazebného povrchu pro sloučeninu S9_19 a charakterizace její interakce s DBD FOXO3

Vyhodnocení CSP: Pro identifikaci vazebného povrchu pro sloučeninu S9_19 v rámci DBD FOXO3 byl proveden 2D ^{1}H-^{15}N HSQC experiment. Vazebný povrch byl

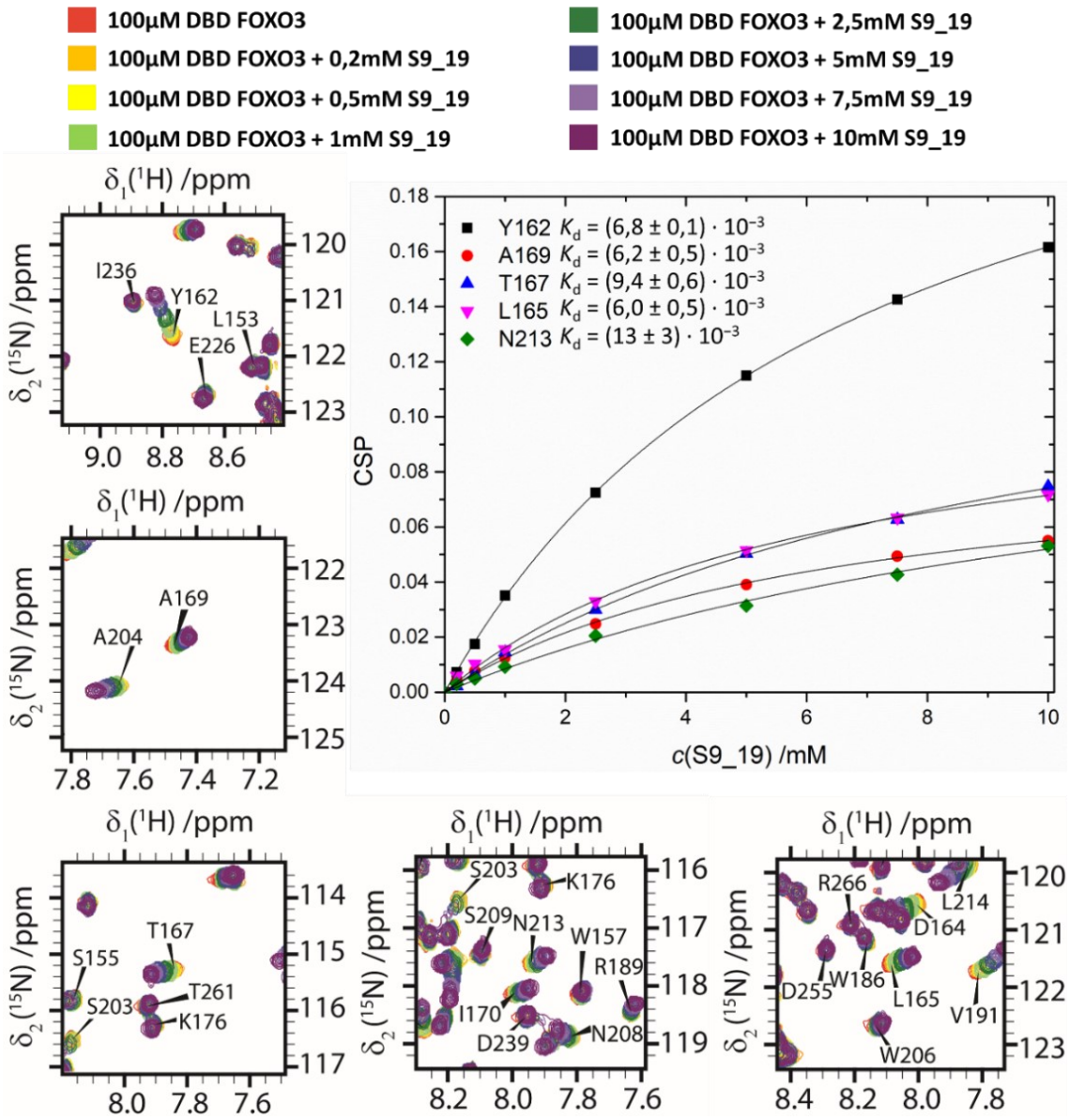
identifikován pomocí změn chemického posunu, CSP, způsobených přídavkem 0,7mM sloučeniny S9_19. Koncentrace DBD FOXO3 byla 100μM, experiment byl naměřen v 20mM fosfátovém pufru o pH 6,5, složení viz tab. 10.22 v příloze, str. 108. Změny chemického posunu indukované přídavkem 0,7mM sloučeniny S9_19 byly vypočteny dle vztahu (7), str. 58, a byly malé, což poukazuje na nízkou vazebnou afinitu vůči DBD FOXO3. Nejvíce byly vazbou sloučeniny ovlivněny chemické posuny N-H skupin α-helixu H3, klíčového pro vazbu DNA, α-helixu H2 a N-konce, viz obr. 6.14, str. 75. Obr. 6.14, str. 75, ukazuje výřezy z ^{1}H-^{15}N HSQC spektra, celé spektrum je uvedeno na obr. 10.3 v příloze, str. 110. Aminokyseliny nejvíce ovlivněné vazbou sloučeniny S9_19, tzn. aminokyseliny se signifikantní CSP N-H skupiny peptidové vazby, jsou N159, L160, Y162, D164 a L165 z N-konce, K207, H212 a N213 z α-helixu H3, L180 a S181 z α-helixu H2, R219 a F220 z oblasti mezi α-helixem H3 a β-listem S2, S231, W234 a N237 z W1 smyčky a β-listu S3 a R249 a R250 z C-konce. Z toho residua účastnící se vazby na DNA jsou Y162, L180, K207, R211, H212 a R250. Z ^{1}H-^{15}N HSQC experimentu tak vyplývá, že sloučenina S9_19 se váže do oblasti DBD FOXO3, která je klíčová pro vazbu na DNA a blokuje tak DNA-vazebný povrch. NMR data byla následně vizualizována pomocí molekulového dokování, viz obr. 6.18, str. 79.



Obr. 6.14 ^{1}H-^{15}N HSQC experiment s DBD FOXO3 a sloučeninou S9_19. V horní části obrázku jsou výřezy z překryvu ^{1}H-^{15}N HSQC, červeně spektrum samotné DBD FOXO3, modře spektrum DBD FOXO3 v přítomnosti sloučeniny S9_19. Výřezy byly vytvořeny s pomocí programu Adobe Illustrator CC, v. 23.0.2, Adobe Inc. V dolní části je grafické znázornění změn chemických posunů, CSP, v závislosti na sekvenci FOXO3. Pozn.: Chybějící píky značí píky, jejichž pozice nebyla v ^{1}H-^{15}N HSQC spektru s přídavkem sloučeniny S9_19 identifikována. Graf byl vytvořen v programu OriginPro, v. 9, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.

Odhad disociační konstanty komplexu sl. S9_19 s DBD FOXO3: Sloučenina S9_19 je dobře rozpustná ve vodném prostředí, proto byla provedena titrace za účelem odhadu disociační konstanty. Odhad disociační konstanty byl proveden na základě závislosti CSP aminokyselin DBD FOXO3 na koncentraci sloučeniny S9_19, přičemž koncentrace proteinu byla v každém bodě titrace 100µM. Vzhledem k přítomnosti acidobazické guanidinové skupiny byl pro titraci použit fosfátový pufr o vyšší koncentraci, tj.100mM, složení viz tab. 10.27 v příloze, str. 109, aby bylo zamezeno výkyvu pH při vysokých koncentracích sloučeniny S9_19 (tj. vyšších než 5mM). Titrace byla naměřena na 850MHz spektrometru Bruker Avance III (Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.). Hodnoty CSP byly vypočteny dle vztahu (7), str. 58. Disociační konstanta byla určena nelineární regresí pomocí vztahu (8), str. 58, a pohybuje se v nízké milimolární oblasti, viz

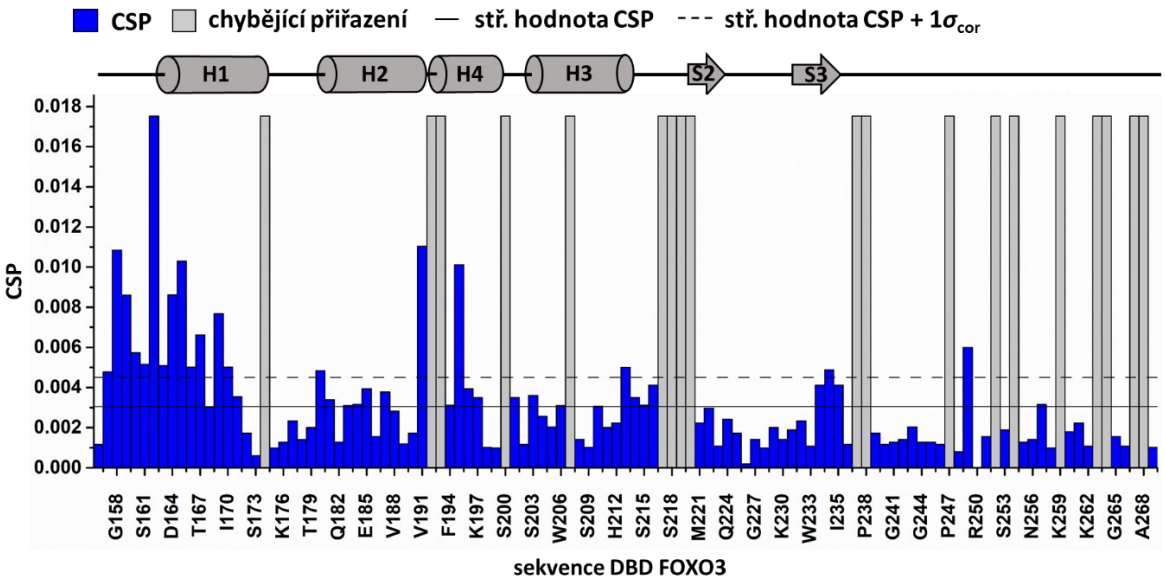
obr. 6.15. Obr. 6.15, ukazuje výřezy z ^{1}H-^{15}N HSQC spektra, celé spektrum je uvedeno na obr. 10.4 v příloze, str. 111.



Obr. 6.15 Určení disociační konstanty komplexu sloučeniny S9_19 s DBD FOXO3. Na obrázku jsou zobrazeny výřezy z ^{1}H-^{15}N HSQC spektra s detailem píků, jejichž CSP byly použity pro výpočet disociační konstanty. Výřezy byly vytvořeny s pomocí programu Adobe Illustrator CC, v. 23.0.2, Adobe Inc. Celé ^{1}H-^{15}N HSQC spektrum je na obr. 10.4 v příloze, str. 111. Výpočet disociační konstanty byl proveden pomocí nelineární regrese s využitím vztahu (8), str. 58, v programu OriginPro, v. 9, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.

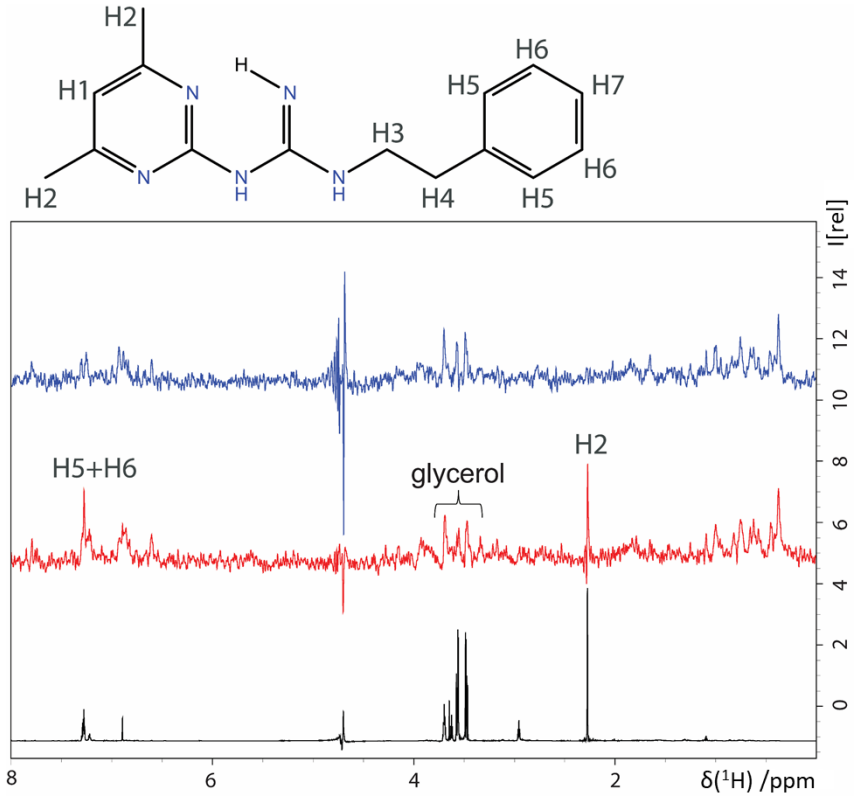
Zajímavým faktem je, že v prostředí 100mM fosfátového pufru o pH 6,5 se distribuce CSP v závislosti na sekvenci FOXO3, viz obr. 6.16, str. 77, liší od distribuce v 20mM fosfátovém pufru o pH 6,5, viz obr. 6.14, str. 75. Zatímco v 20mM fosfátovém pufru interaguje sloučenina S9_19 jak s N-koncem DBD FOXO3, tak s oblastí

DNA-vazebného α-helixu H3, ve 100mM fosfátovém pufru interaguje pouze s N-koncovou částí. Interakce DBD FOXO3 se sloučeninou S9_19 je tak výrazně ovlivněna iontovou silou pufru, kdy přítomnost vyšší iontové síly ve 100mM fosfátovém pufru může narušit některé iontové interakce.



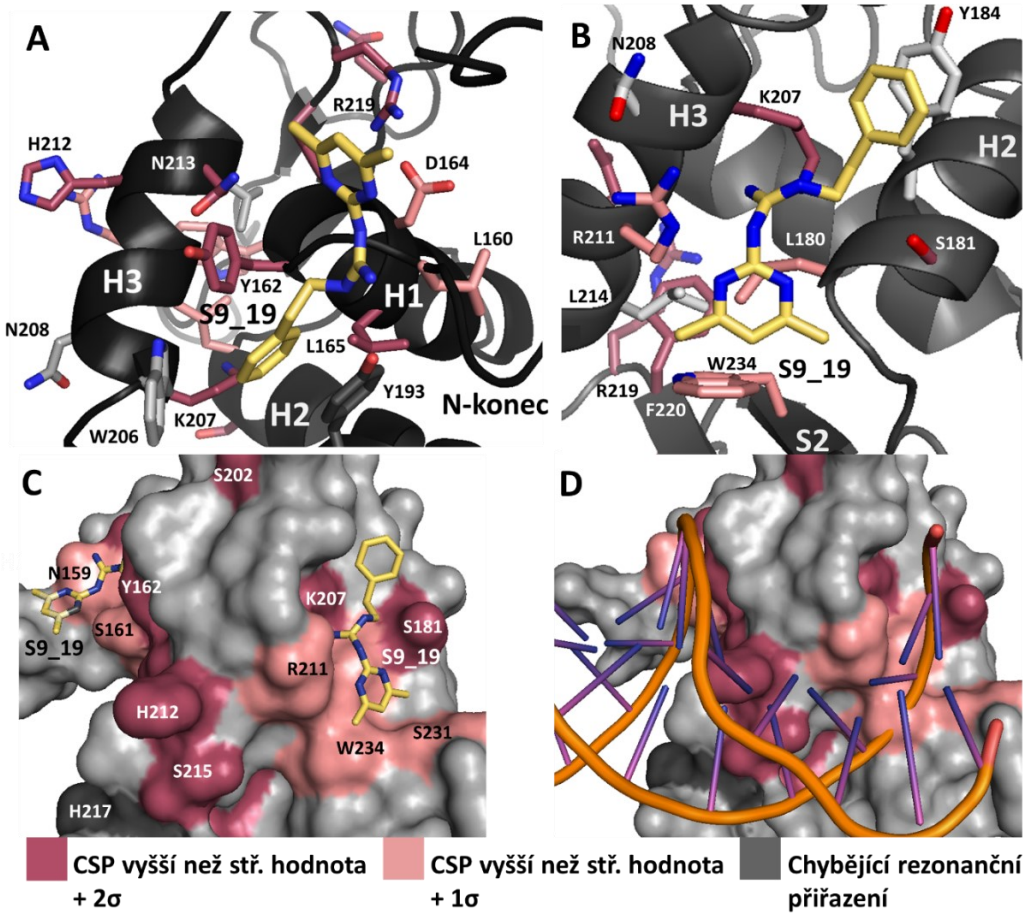
Obr. 6.16 Graf CSP po přídavku sloučeniny S9_19 v závislosti na sekvenci FOXO3. Změny byly indukovány přídavkem 500μM sloučeniny S9_19, měření probíhalo ve 100mM fosfátovém pufru, složení viz tab. 10.27 v příloze, str. 109. Obrázek byl vytvořen v programu OriginPro, v. 9, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA

STD experiment: Pro potvrzení přímé interakce sloučeniny S9_19 s DBD FOXO3 a informaci o interagujících skupinách této sloučeniny byl proveden STD experiment se vzorkem 15μM proteinu a 1mM sloučeniny S9_19. Měření probíhalo v 20mM fosfátovém pufru o pH 6,5, složení viz tab. 10.22 v příloze, str. 108. Výsledné STD spektrum je uvedeno na obr. 6.17, str. 78. V STD spektru jsou vidět signály methylových skupin pyrimidinového kruhu a ^{1}H jader fenylového kruhu, které se nachází v přímé blízkosti molekuly proteinu.



Obr. 6.17 STD experiment s DBD FOXO3 a sloučeninou S9_19. Černě je ^{1}H spektrum s nezměněnými intenzitami signálů. Modře je kontrolní STD experiment – STD experiment se samotnou DBD FOXO3. Červeně je STD experiment se sloučeninou S9_19. Z STD spektra v přítomnosti sloučeniny S9_19 je patrné, že s DBD FOXO3 přímo interagují methylové skupiny pyrimidinového kruhu a také vodíky druhého aromatického kruhu. Obrázek byl vytvořen s pomocí programu Adobe Illustrator CC, v. 23.0.2, Adobe Inc.

Molekulové dokování: 2D ^{1}H-^{15}N HSQC experiment, viz Vyhodnocení CSP, str. 73, poskytl informaci o vazebném povrchu pro sloučeninu S9_19 v rámci DBD FOXO3. Pro vizualizaci NMR dat bylo použito molekulové dokování s využitím programu AutoDock Vina [95]. Dokování bylo provedeno podle postupu uvedeném v kapitole 5.3.5, str. 60. Jako flexibilní byly vybrány především postranní řetězce aminokyselin se signifikantní CSP. Dále byly přidány některé další aminokyseliny v blízkém okolí. Pro dokování sloučeniny S9_19 byly jako flexibilní vybrány tyto aminokyseliny: N159, L160, S161, Y162, D164, L165, L180, S181, V191, Y193, S202, W206, K207, N208, R211, H212, N213, L214, R219, F220 A W234. Výsledkem molekulového dokování byly dvě reprezentativní konformace, viz obr. 6.18, str. 79, které korespondují s daty získanými pomocí NMR. Sloučenina S9_19 tak může interagovat jak s N-koncovou oblastí, tak s oblastmí α-helixů H2 a H3. Obě tyto oblasti jsou klíčové pro interakci DBD FOXO3 s DNA, což je patrné z obr. 6.18 D, str. 79. Sloučenina S9_19 vazbou na tuto oblast DBD FOXO3 blokuje DNA-vazebný povrch.

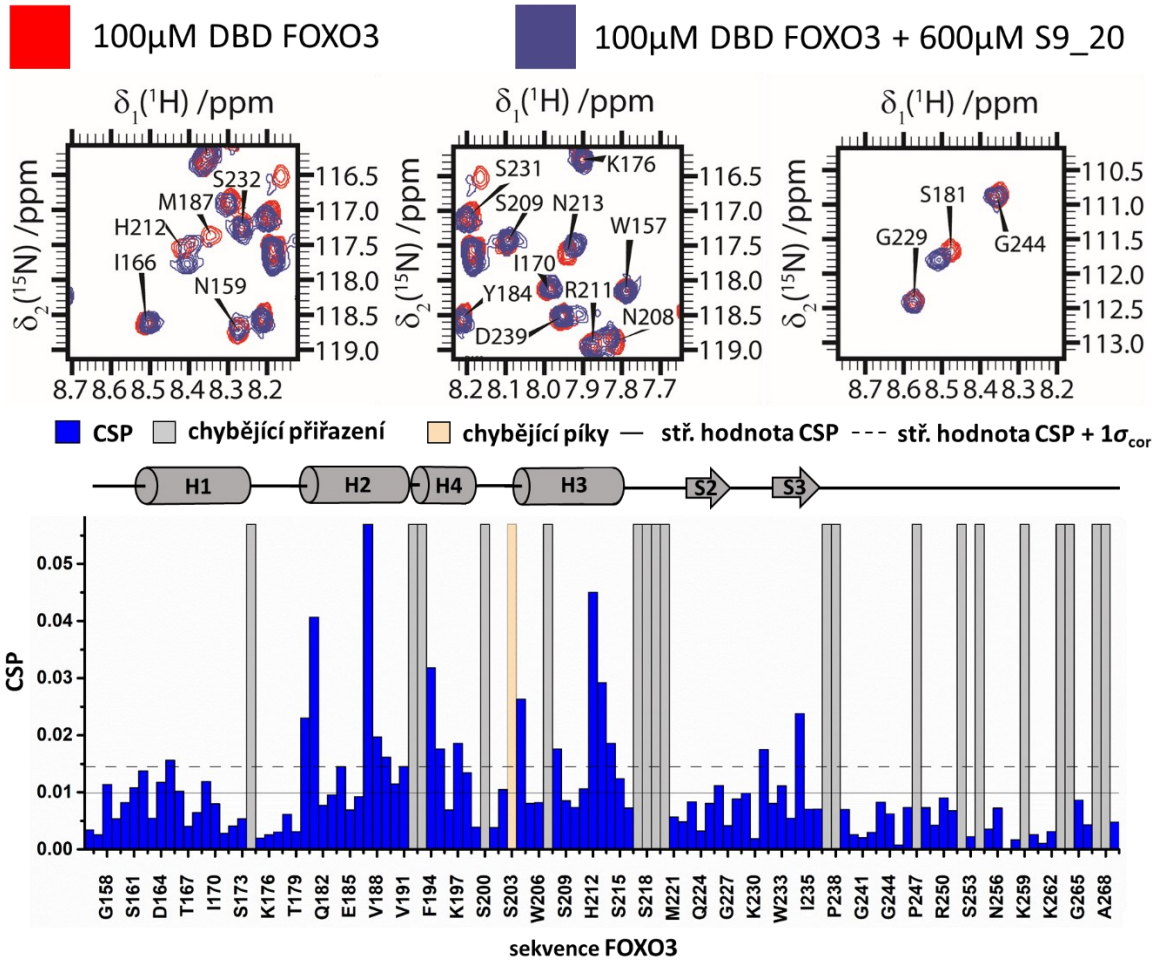


Obr. 6.18 Ilustrace možné vazebné konformace sloučeniny S9_19 – vizualizace NMR dat. Aminokyseliny se signifikantní CSP (na základě ^{1}H-^{15}N HSQC experimentu, viz Vyhodnocení CSP, str. 73) jsou barevně vyznačeny, viz legenda pod obrázkem. **A** Jedna z vazebných konformací získaná pomocí molekulového dokování. Sloučenina S9_19 zde interaguje s N-koncovou částí DBD FOXO3. **B** Jedna z vazebných konformací získaná pomocí molekulového dokování. Sloučenina S9_19 zde interaguje s oblastí α-helixů H2 a H3. **C** Vizualizace NMR dat pomocí molekulového dokování. Aminokyseliny se signifikantní CSP jsou barevně vyznačeny. Na obrázku jsou zobrazeny dvě reprezentativní konformace získané na základě molekulového dokování. **D** Ilustrativní zobrazení DNA-vazebného povrchu. Z obrázku je patrné, že obě vazebné konformace sloučeniny S9_19 se nachází v rámci DNA-vazebného místa DBD FOXO3. Obrázky byly vyrobeny s pomocí programu The PyMol Molecular Graphics System, v.0.99, Shrödinger, LLC.

6.2.7 Identifikace vazebného povrchu pro sloučeninu S9_20 a charakterizace její interakce s DBD FOXO3

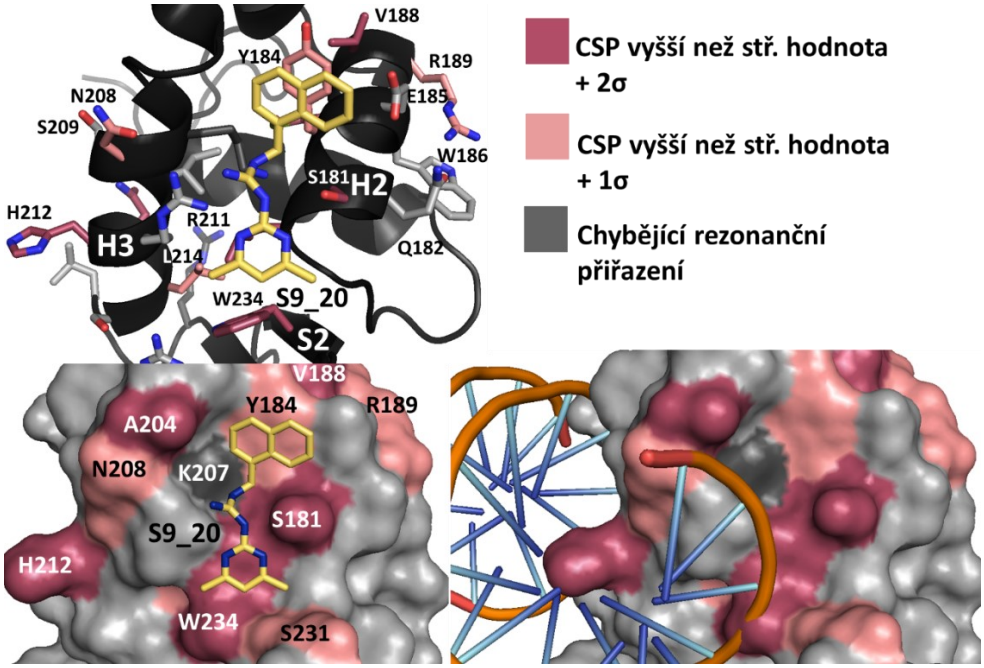
Vyhodnocení CSP: Za účelem získání informace o vazebném povrchu pro sloučeninu S9_20 v rámci DBD FOXO3 byl proveden 2D ^{1}H-^{15}N HSQC experiment. Narozdíl od sloučeniny S9_19 je rozpustnost sloučeniny S9_20 ve vodném prostředí velmi nízká. Pro ^{1}H-^{15}N HSQC experiment tak byla použita nejvyšší dosažitelná koncentrace, tj. 600μM. Koncentrace proteinu byla 100μM. Experiment byl vzhledem k faktu, že sloučenina S9_20 ovlivňuje pH 20mM fosfátového pufru o pH 6,5 proveden ve 100mM fosfátovém pufru o

pH 6,5, složení viz tab. 10.27 v příloze, str. 109. CSP byly vypočteny dle vztahu (7), str. 58. Výsledky experimentu ukázaly, že nejvíce jsou ovlivněny chemické posuny N-H skupin α-helixu H3, klíčového pro vazbu DNA, a α-helixu H2, viz obr. 6.19. Obr. 6.19 ukazuje výřezy z ^{1}H-^{15}N HSQC spektra, celé spektrum je uvedeno na obr. 10.5 v příloze, str. 112. Narozdíl od sloučeniny S9_19, viz kapitola 6.2.6, str. 73, není vazbou sloučeniny S9_20 významně ovlivněn N-konec DBD FOXO3. Stejně jako u sloučeniny S9_19 jsou však ovlivněny chemické posuny aminokyselin klíčových pro interakci s DNA. Jde o L180, N208, H212, W234 a R249. Výsledky ^{1}H-^{15}N HSQC experimentu naznačují, že sloučenina S9_20 se váže do oblasti DBD FOXO3 klíčové pro vazbu DNA. NMR data byla dále vizualizována pomocí molekulového dokování, viz obr. 6.20, str. 81.



Obr. 6.19 ^{1}H-^{15}N HSQC experiment s DBD FOXO3 a sloučeninou S9_20. V horní části obrázku jsou výřezy z překryvu ^{1}H-^{15}N HSQC spekter, červeně spektrum samotné DBD FOXO3, modře spektrum DBD FOXO3 v přítomnosti sloučeniny S9_20. Výřezy byly vytvořeny s pomocí programu Adobe Illustrator CC, v. 23.0.2, Adobe Inc. V dolní části je grafické znázornění změn chemických posunů, CSP, v závislosti na sekvenci FOXO3. Pozn.: Chybějící píky značí píky, jejichž pozice nebyla v ^{1}H-^{15}N HSQC spektru s přídavkem sloučeniny S9_20 identifikována. Graf byl vytvořen v programu OriginPro, v. 9, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.

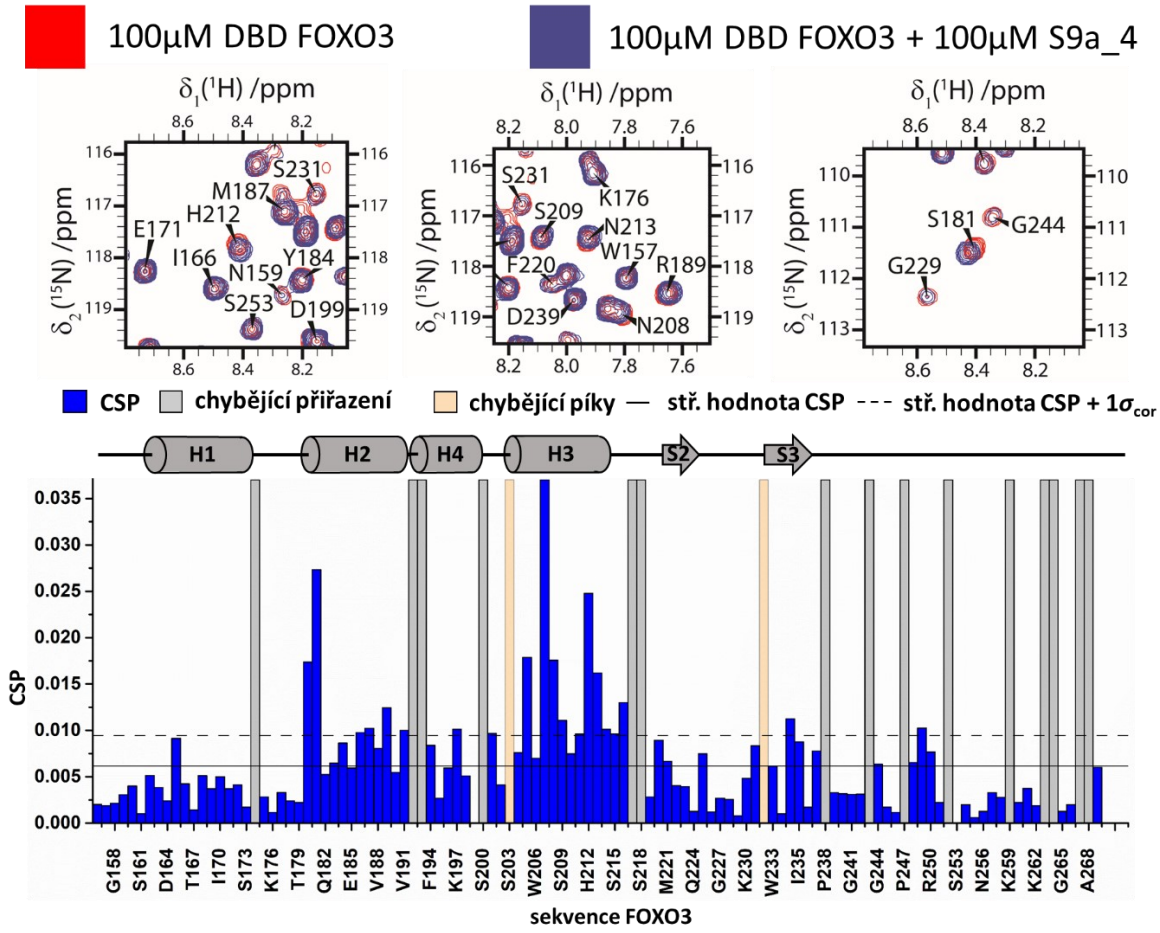
Molekulové dokování: 2D ^{1}H-^{15}N HSQC experiment, viz Vyhodnocení CSP, str. 79, poskytl informaci o vazebném povrchu pro sloučeninu S9_20 v rámci DBD FOXO3. Pro vizualizaci NMR dat bylo použito molekulové dokování s využitím programu AutoDock Vina [95]. Dokování bylo provedeno podle postupu uvedeném v oddíle 5.3.5 Molekulové dokování, str. 60. Jako flexibilní byly vybrány postranní řetězce aminokyselin se signifikantní CSP. Dále byly přidány některé další aminokyseliny v blízkém okolí. Pro dokování sloučeniny S9_20 byly jako flexibilní vybrány tyto aminokyseliny: L180, S181, Q182, Y184, E185, W186, M187, V188, R189, V191, K197, N201, S203, K207, N208, S209, R211, H212, N213, L214, S215, L216, R222 a W234. Získaná vazebná konformace je v souladu s NMR daty, viz obr. 6.20. Sloučenina S9_20 interaguje s oblastí α-helixů H2 a H3. Z obr. 6.20 C vyplývá, že sloučenina S9_20 se analogicky jako sloučenina S9_19 váže do oblasti DBD FOXO3 klíčové pro vazbu DNA.



Obr. 6.20 Ilustrace možné vazebné konformace sloučeniny S9_20 – vizualizace NMR dat. Aminokyseliny se signifikantní CSP (na základě ^{1}H-^{15}N HSQC experimentu, viz Vyhodnocení CSP, str. 79) jsou barevně vyznačeny, viz legenda vpravo. **A** Vazebná konformace získaná pomocí molekulového dokování. Sloučenina S9_20 zde interaguje s α-helixy H2 a H3 DBD FOXO3. **B** Vizualizace NMR dat pomocí molekulového dokování. Aminokyseliny se signifikantní CSP jsou barevně vyznačeny (viz legenda). **C** Ilustrativní zobrazení DNA-vazebného povrchu. Z obrázku je patrné, že vazebná konformace sloučeniny S9_20 se nachází v rámci DNA-vazebného místa DBD FOXO3. Obrázky byly vyrobeny s pomocí programu The PyMol Molecular Graphics System, v.0.99, Shrödinger, LLC.

6.2.8 Identifikace vazebného povrchu pro sloučeninu S9a_4 a charakterizace její interakce s DBD FOXO3

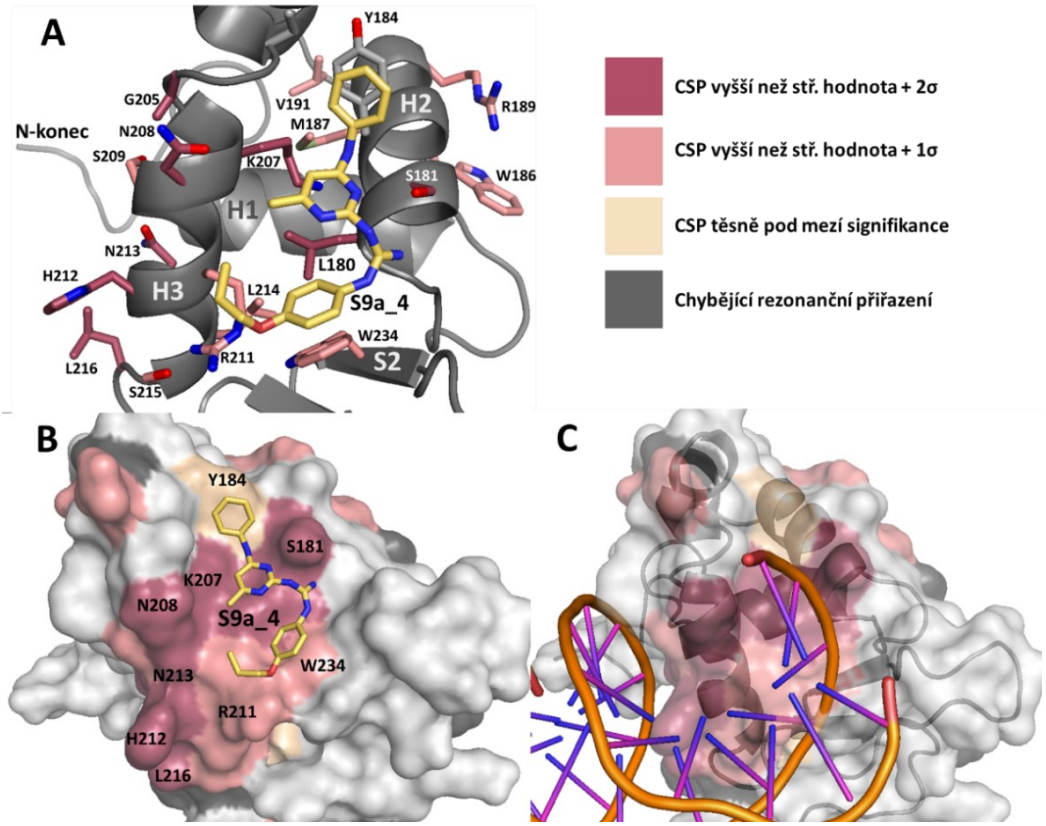
Vyhodnocení CSP: Pro identifikaci vazebného povrchu sloučeniny S9a_4 byl proveden ^{1}H-^{15}N HSQC experiment. Rozpustnost sloučeniny S9a_4 v 20mM fosfátovém pufru o pH 6,5, složení viz tab. 10.22 v příloze, str. 108, v němž byl experiment proveden, je velmi nízká. Proto byla pro experiment použita nejvyšší dosažitelná koncentrace sloučeniny S9a_4, tj. 100μM. Koncentrace DBD FOXO3 byla rovněž 100μM. Hodnoty CSP byly vypočteny dle vztahu (7), str. 58. Výsledky tohoto experimentu ukázaly, že vazbou sloučeniny S9a_4 jsou nejvíce ovlivněny chemické posuny N-H skupin α-helixu H3, klíčového pro vazbu DNA, a α-helixu H2, viz obr. 6.21, str. 83. Obr. 6.21 ukazuje výřezy z ^{1}H-^{15}N HSQC spektra, celé spektrum je uvedeno na obr. 10.6 v příloze, str. 113. Aminokyseliny nejvíce ovlivněné vazbou sloučeniny S9a_4, tj. se signifikantní CSP N-H skupin peptidové vazby, jsou G205, K207, N208, S209, R211, H212, N213, L214 a S215 z α-helixu H3, L180, S181, W186, M187, R189 a V191 z α-helixu H2, W234 z W1 smyčky a R249 z C-konce. Z toho residua účastnící se vazby na DNA jsou K207, N208, R211, H212, S215, L180, W234 a R249. Z ^{1}H-^{15}N HSQC experimentu vyplývá, že sloučenina S9a_4 interaguje s oblastí DBD FOXO3 klíčovou pro vazbu na DNA. NMR data byla dále vizualizována pomocí molekulového dokování, viz obr. 6.22, str. 84.



Obr. 6.21 ^{1}H-^{15}N HSQC experiment s DBD FOXO3 a sloučeninou S9a_4. V horní části obrázku jsou výřezy z překryvu ^{1}H-^{15}N HSQC spekter, modře spektrum samotné 100µM DBD FOXO3, červeně spektrum 100µM DBD FOXO3 v přítomnosti 100µM sloučeniny S9a_4. Výřezy byly vytvořeny s pomocí programu Adobe Illustrator CC, v. 23.0.2, Adobe Inc. V dolní části je grafické znázornění změn chemických posunů, CSP, v závislosti na sekvenci FOXO3. Pozn.: Chybějící píky značí píky, jejichž pozice nebyla v ^{1}H-^{15}N HSQC spektru s přídavkem sloučeniny S9a_4 identifikována. Graf byl vytvořen v programu OriginPro, v. 9, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.

Molekulové dokování: 2D ^{1}H-^{15}N HSQC experiment, viz Vyhodnocení CSP, str. 82, poskytl informaci o vazebném povrchu pro sloučeninu S9a_4 v rámci DBD FOXO3. Pro vizualizaci NMR dat bylo použito molekulové dokování s využitím programu AutoDock Vina [95]. Dokování bylo provedeno podle postupu uvedeném v oddíle 5.3.5 Molekulové dokování, str. 60. Jako flexibilní byly vybrány postranní řetězce aminokyselin se signifikantní CSP. Dále byly přidány některé další aminokyseliny v blízkém okolí. Pro dokování sloučeniny S9a_4 byly jako flexibilní vybrány tyto aminokyseliny: L180, S181, Y184, W186, M187, R189, V191, K197, N201, S203, K207, N208, S209, R211, H212, N213, L214, S215, L216, R222 a W234. Výsledná reprezentativní konformace získaná na základě molekulového dokování je zobrazena na obr. 6.22, str. 84. Z obrázku je patrné, že sloučenina S9a_4 interaguje s oblastí α-helixů H2 a H3, což je konzistentní s NMR daty,

viz obr. 6.22 B. Sloučenina S9a_4 tak interaguje s oblastí DBD FOXO3, která je klíčová pro vazbu na DNA, viz obr. 6.22 C, a tím blokuje DNA-vazebné místo.

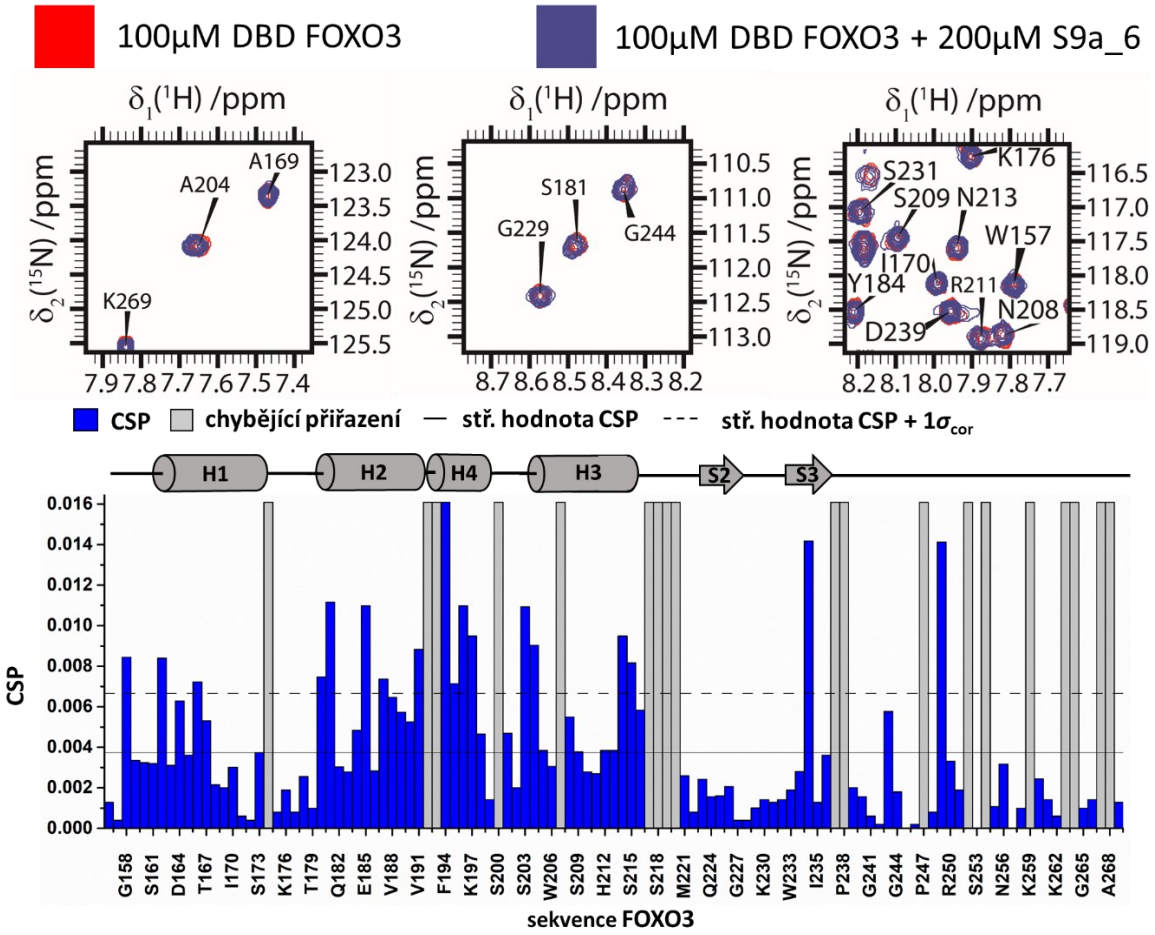


Obr. 6.22 Ilustrace možné vazebné konformace sloučeniny S9a_4 – vizualizace NMR dat. Aminokyseliny se signifikantní CSP (na základě ^{1}H-^{15}N HSQC experimentu) jsou barevně vyznačeny, viz legenda vpravo. **A** Vazebná konformace získaná pomocí molekulového dokování. Sloučenina S9a_4 zde interaguje s α-helixy H2 a H3 DBD FOXO3. **B** Vizualizace NMR dat pomocí molekulového dokování. Aminokyseliny se signifikantní CSP jsou barevně vyznačeny (viz legenda). **C** Ilustrativní zobrazení DNA-vazebného povrchu. Z obrázku je patrné, že vazebná konformace sloučeniny S9a_4 se nachází v rámci DNA-vazebného místa DBD FOXO3. Obrázky byly vyrobeny s pomocí programu The PyMol Molecular Graphics System, v.0.99, Shrödinger, LLC.

6.2.9 Identifikace vazebného povrchu pro sloučeninu S9a_6 a charakterizace její interakce s DBD FOXO3

Vyhodnocení CSP: Pro identifikaci vazebného povrchu sloučeniny S9a_6 byl proveden ^{1}H-^{15}N HSQC experiment. Rozpustnost sloučeniny S9a_6 ve vodném prostředí je nízká, proto byla pro experiment použita nejvyšší možná koncentrace, tj. 200μM. Sloučenina S9a_6 i při takto nízkých koncentracích ovlivňuje pH 20mM fosfátového pufru o pH 6,5, proto byl pro měření se sloučeninou S9a_6 použit 100mM fosfátový pufr o pH 6,5, složení viz tab. 10.27 v příloze, str. 109. Hodnoty CSP byly vypočteny dle vztahu (7), str. 58.

Výsledné CSP indukované přídavkem 200μM sloučeniny S9a_6 jsou velmi malé, viz obr. 6.23, str. 86, v porovnání s CSP u strukturně podobné sloučeniny S9a_4, viz obr. 6.21, str. 83. Tento rozdíl může být způsoben jak odlišnou afinitou těchto dvou sloučenin vůči DBD FOXO3, tak rozdílem iontové síly použitého pufru. 100mM fosfátový pufr o pH 6,5, použitý pro experiment se sloučeninou S9a_6, mohl negativně ovlivnit řadu iontových interakcí. Nicméně výsledek ^{1}H-^{15}N HSQC experimentu ukázal, že vazbou sloučeniny S9a_6 na DBD FOXO3 jsou nejvíce ovlivněny chemické posuny N-H skupin α-helixu H3, klíčového pro vazbu DNA, a α-helixu H2 viz obr. 6.23, str. 86. Obr. 6.23, str. 86, ukazuje výřezy z ^{1}H-^{15}N HSQC spektra, celé spektrum je uvedeno na obr. 10.7 v příloze, str. 114. Stejně jako sloučenina S9a_4 ovlivňuje sloučenina Sa_6 chemické posuny aminokyselin, které jsou klíčové pro vazbu na DNA. Jde o Y162, L180, W234 a R249. Z ^{1}H-^{15}N HSQC experimentu tak vyplývá, že sloučenina S9a_6 se analogicky s předchozími sloučeninami váže do oblasti α-helixů H2 a H3, která je klíčová pro vazbu na DNA.



Obr. 6.23 1H-15N HSQC experiment s DBD FOXO3 a sloučeninou S9a_6. V horní části obrázku jsou výřezy z překryvu ^{1}H-^{15}N HSQC spekter, modře spektrum samotné 100µM DBD FOXO3, červeně spektrum 100µM DBD FOXO3 v přítomnosti 100µM sloučeniny S9a_6. Výřezy byly vytvořeny s pomocí programu Adobe Illustrator CC, v. 23.0.2, Adobe Inc. V dolní části je grafické znázornění změn chemických posunů, CSP, v závislosti na sekvenci FOXO3. Graf byl vytvořen v programu OriginPro, v. 9, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.

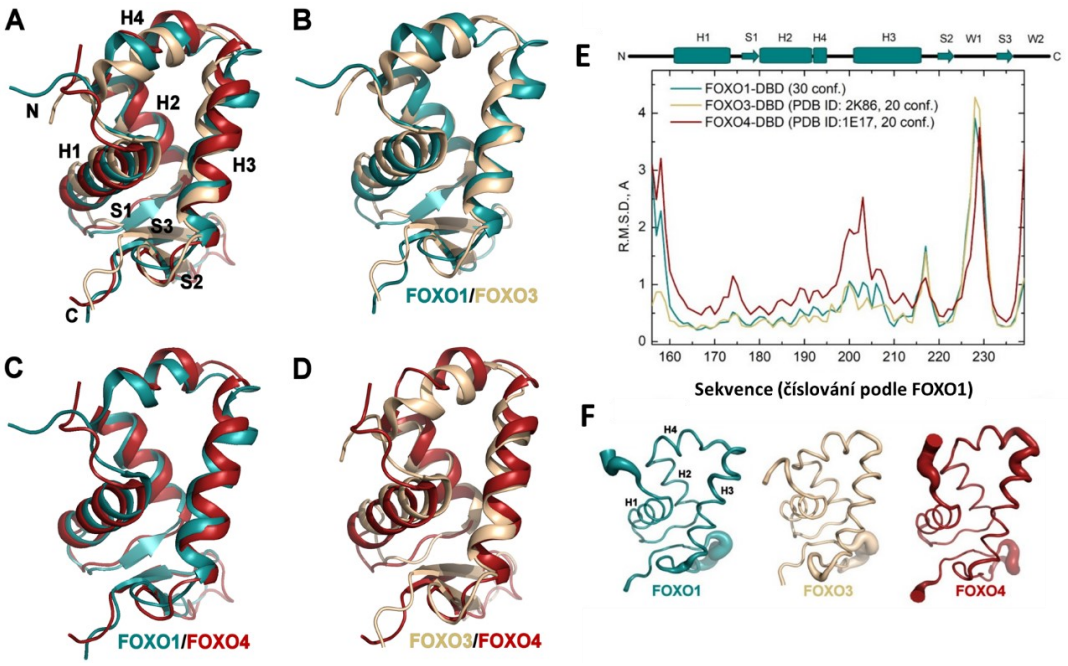
Molekulové dokování: Molekulové dokování se sloučeninou S9a_6 nebylo z časových důvodů dokončeno.

7 Diskuze

Cílem této práce bylo získat rezonanční přiřazení ^{1}H-^{15}N HSQC spektra DBD FOXO1 a vyřešit strukturu tohoto proteinu. Dalším cílem bylo ověřit schopnost derivátů sloučeniny S9 inhibovat interakci FOXO3 s DNA a charakterizovat interakci těchto nízkomolekulárních látek s DBD FOXO3. Prvním krokem k naplnění vytyčených cílů byla příprava neznačených a izotopově (^{13}C, ^{15}N) značených DBD obou proteinů. Značené i neznačené proteiny se podařilo vypurifikovat v dostatečné čistotě a množství pro všechny experimenty provedené v této práci.

V ^{1}H-^{15}N HSQC spektru DBD FOXO1 bylo přiřazeno 104 ze 111 N-H skupin peptidové vazby (v sekvenci 114 aminokyselin jsou 3 proliny), přiřazena tak byla většina píků (94 %). Přiřazeny byly i některé rezonance N-H skupin postranních řetězců aminokyselin. S pomocí standardních 3D NMR experimentů byla přiřazeny rezonance hlavního řetězce i postranních řetězců aminokyselin. S pomocí chemických posunů přiřazených atomů proteinové páteře a vzdálenostních omezení získaných na základě NOE experimentů byla vyřešena struktura volné DBD FOXO1. Struktura DBD FOXO1 má, podobně jako ostatní FOXO proteiny, charakteristický motiv "okřídleného" helixu, je tvořena čtyřmi helixy, H1–H4, třemi β-listy, S1–S3, a dvěma smyčkami, W1 a W2.

Struktura DBD FOXO1 je poslední chybějící strukturou volné DBD FOXO proteinů (nepočítaje DBD FOXO6), na tomto místě se tak nabízí jejich strukturní srovnání. Porovnání struktur volných DBD FOXO proteinů, tj. DBD FOXO1, FOXO3 a FOXO4, poukazuje nejen na strukturní rozdíly, ale i na rozdíly ve flexibilitě některých oblastí. Nejsignifikantnější rozdíly ve struktuře vykazují oblasti mezi α-helixy H2 a H3, kde se nachází i helix H4, a N-koncová část α-helixu H3, viz. obr. 7.1 A–E, str. 88. Zatímco FOXO1 a FOXO3 se ve své flexibilitě významně neliší, FOXO4 vykazuje výrazně vyšší flexibilitu v oblasti DNA-vazebného α-helixu H3, viz obr. 7.1 E a F, str. 88. Právě tyto drobné strukturní rozdíly mohou přispívat k rozdílným interakcím FOXO proteinů s DNA.



Obr. 7.1 Srovnání struktur DNA vazebných domén FOXO transkripčních faktorů. A Srovnání DBD FOXO1 (modře), FOXO3 (béžově) a FOXO4 (červeně). Srovnání ukazuje strukturní rozdíly, které jsou nejvýraznější v oblasti helixu H4 a N-koncové části α-helixu H3. **B–D** Srovnání DBD FOXO proteinů. **E** Graf závislosti R.M.S.D od průměru v závislosti na sekvenci FOXO1. Graf poukazuje na vyšší flexibilitu DBD FOXO4 v oblasti mezi α-helixy H1 a H2 a N-koncové části α-helixu H3 oproti DBD FOXO1 a FOXO3. **F** Tunelová reprezentace souboru NMR struktur FOXO1 (modře), FOXO3 (béžově) a FOXO4 (červeně). Tato reprezentace rovněž znázorňuje strukturní flexibilitu DBD FOXO proteinů. Převzato a upraveno z [54].

Kromě struktury volné DBD FOXO1 má velký význam i rezonanční přiřazení jejího ^{1}H-^{15}N HSQC spektra. Přiřazení tohoto spektra poskytuje možný nástroj pro studium a vývoj dalších specifických inhibitorů FOXO1, které mají klinický význam zejména při léčbě poruch metabolismu, jako je obezita a *diabetes mellitus* typu II. V návaznosti na tuto práci bude rezonanční přiřazení ^{1}H-^{15}N HSQC spektra DBD FOXO1 využito pro ověření specifity derivátů sloučeniny S9. Je totiž žádoucí, aby tyto látky interagovaly přednostně s DBD FOXO3.

Tato práce navazuje na již publikované výsledky, které ukazují, že sloučenina S9 je inhibitorem FOXO3 transkripční aktivity (potvrzeno experimenty na tkáňových kulturách buněk lidského neuroblastomu, SH-EP linie, experimenty provedla laboratoř prof. M. J. Ausserlechnera, Department of Pediatrics I, Medizinische Universität Innsbruck, Rakousko). Sloučenina S9 se váže na DBD FOXO3 v oblasti DNA-vazebného α-helixu H3 a blokuje tak DNA-vazebný povrch [69]. V této práci jsou studovány deriváty původní sloučeniny S9. Jejich schopnost inhibovat interakci DBD FOXO3 s DNA byla ověřena pomocí nativní elektroforézy. Výsledky nativní elektroforézy ukázaly, že všechny

studované nízkomolekulární látky jsou do určité míry schopny inhibovat interakci DBD FOXO3 s DNA obsahující IRE motiv. Méně rozpustné inhibitory, jmenovitě S9a_3; S9a_4; S9a_5, S9a_6, S9_17 a S9_20 byly schopny signifikantně inhibovat interakci DBD FOXO3 s DNA již při koncentraci v řádu desítek mikromolární. Narozdíl od původní sloučeniny S9, která vykazovala inhibiční efekt při řádově vyšší koncentraci, jsou nové deriváty lepšími inhibitory interakce DBD FOXO3 s DNA.

Schopnost derivátů sloučeniny S9 interagovat s DBD FOXO3 byla ověřena pomocí STD NMR experimentu. Všechny deriváty sloučeniny S9, u kterých se podařilo vzhledem k jejich rozpustnosti ve fosfátovém pufru pro NMR měření STD spektrum naměřit, interagují s DBD FOXO3.

Sloučeniny S9_19, S9_20, S9a_4 a S9a_6 vykazovaly největší inhibiční efekt na transkripční aktivitu FOXO3 v tkáňových kulturách buněk lidského neuroblastomu (experimenty provedla skupina prof. M. J. Ausserlechnera, Department of Pediatrics I, Medizinische Universität Innsbruck, Rakousko). Interakce těchto nízkomolekulárních látek s DBD FOXO3 byla detailně studována. Výsledky ^{1}H-^{15}N HSQC experimentu dokreslené molekulovým dokováním ukázaly, že tyto sloučeniny se váží do oblasti α-helixů H2 a H3 DBD FOXO3. Tato oblast je klíčová pro vazbu na DNA. Sloučeniny S9_19, S9_20, S9a_4 a S9a_6 tak blokují DNA-vazebný povrch DBD FOXO3 a brání její vazbě na DNA.

U sloučeniny S9_19, která je dobře rozpustná v pufru pro NMR měření, byl proveden odhad disociační konstanty komplexu s DBD FOXO3. Disociační konstanta byla odhadnuta na základě závislosti CSP pěti aminokyselin na koncentraci sloučeniny S9_19 a pohybuje se v nízké milimolární oblasti. Paralelně byl proveden odhad inhibičních konstant látek S9_19, S9_20, S9a_4 a S9a_6, IC_{50}, v tkáňových kulturách buněk lidského neuroblastomu, ty se pohybují submikromolární oblasti (odhad provedla skupina prof. M. J. Ausserlechnera, Department of Pediatrics I, Medizinische Universität Innsbruck, Rakousko). Je zde tedy poměrně velký nesoulad v hodnotách IC_{50} naměřených v tkáňových kulturách a odhadem disociační konstanty pro komplex S9_19 s rekombinantní isolovanou DBD FOXO3 ve fosfátovém pufru. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben odlišností obou systémů, tedy rozdílem mezi prostředím v buňce a prostředím v kyvetě pro NMR měření. 100mM fosfátový pufr, který musel být pro odhad disociační konstanty použit v důsledku přítomnosti acidobazické guanidinové skupiny sloučeniny S9_19, není vhodným pufrem pro simulaci fyziologického prostředí. Jeho vysoká iontová síla může nepříznivě ovlivnit řadu iontových interakcí. V buňce mohou afinitu sloučenin zároveň

ovlivnit faktory jimiž jsou např. posttranslační modifikace a přítomnost ostatních domén FOXO3 proteinu spolu s přítomností dalších kooperujících transkripčních faktorů.

Výsledky této práce ukázaly, že chemickou modifikací původní sloučeniny S9 bylo dosaženo lepšího inhibičního efektu na tvorbu komplexu transkripčního faktoru FOXO3 s cílovou DNA.

8 Závěr

1. Neznačená i ^{15}N značená DBD FOXO3 byla připravena v dostatečném množství a čistotě pro experimenty provedené v této práci.

2. ^{13}C a ^{15}N značená DBD FOXO1 byla připravena v dostatečném množství pro NMR experimenty nutné pro vyřešení struktury.

3. Pomocí 3D experimentů bylo přiřazeno 104 ze 114 (91 %) píků v 2D 1H-15N HSQC spektru DBD FOXO1. Dále byly přiřazeny rezonance postranních řetězců v dostatečné kvalitě pro výpočet struktury DBD FOXO1.

4. Pomocí nativní elektroforézy bylo ukázáno, že všechny nově syntetizované deriváty původní sloučeniny S9 jsou schopny inhibovat vazbu DBD FOXO3 na DNA-IRE (DNA s IRE motivem).

5. Pomocí STD NMR experimentu, naměřeného s dostatečně rozpustnými inhibitory, bylo potvrzeno, že všechny tyto inhibitory interagují s DBD FOXO3.

6. S pomocí 2D 1H-15N HSQC experimentu byla detailně charakterizována interakce vybraných derivátů, S9_19, S9_20, S9a_4 a S9a_6, s DBD FOXO3. NMR data byla vizualizována s pomocí molekulového dokování a ukázala, že všechny vybrané sloučeniny se váží v rámci DNA-vazebného povrchu DBD FOXO3.

9 Seznam citované literatury

[1] Burgering B. M. T.: A brief introduction to FOXOlogy, *Oncogene*, **27**(16), 2258–2262, 2008

[2] Weigel D.; Jürgens G.; Küttner F.; Seifert E.; Jäckle H.: The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the Drosophila embryo, *Cell*, **57**(4), 645–658, 1989

[3] Hagenbuchner J.; Rupp M.; Salvador C.; Meister B.; Kiechl-Kohlendorfer U.; Müller T.; Geiger K.; Sergi C.; Obexer P.; Ausserlechner M. J.: Nuclear FOXO3 predicts adverse clinical outcome and promotes tumor angiogenesis in neuroblastoma, *Oncotarget*, **7**(47), 77591–77606, 2016

[4] Watson J. D.; Baker T. A.; Bell S. P.; Gann A.; Levine M.; Losick R.: Molecular Biology of the Gene, 7. vydání, Pearson, Londýn, 2013

[5] Transkripce | Genetika - Biologie [Online], [cit. 2.3.2020], dostupné z: http://www.genetika-biologie.cz/transkripce

[6] Jacob F.; Monod J.: Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins, *J. Mol. Biol.*, **3**(3), 318–356, 1961

[7] Lambert S. A.; Jolma A.; Campitelli L. F.; Das P. K.; Yin Y.; Albu M.; Chen X.; Taipale J.; Hughes T. R.; Weirauch M. T.: The Human Transcription Factors, *Cell*, **172**(4), 650–665, 2018

[8] general transcription factor / transcription factor | Learn Science at Scitable [Online], [cit. 10.1.2020], dostupné z: https://www.nature.com/scitable/definition/transcription-factor-167/

[9] Yesudhas D.; Batool M.; Anwar M. A.; Panneerselvam S.; Choi S.: Proteins Recognizing DNA: Structural Uniqueness and Versatility of DNA-Binding Domains in Stem Cell Transcription Factors., *Genes (Basel)*, **8**(8), 2017

[10] Transcription factor - Wikipedia [Online], [cit. 29.4.2020], dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Transcription_factor

[11] Neudegger T.; Verghese J.; Hayer-Hartl M.; Hartl F. U.; Bracher A.: Structure of human heat-shock transcription factor 1 in complex with DNA., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **23**(2), 140–146, 2016

[12] Nair S. K.; Burley S. K.: X-ray structures of Myc-Max and Mad-Max recognizing DNA: Molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors, *Cell*, **112**(2), 193–205, 2003

[13] Liu Y.; Olanrewaju Y. O.; Zheng Y.; Hashimoto H.; Blumenthal R. M.; Zhang X.; Cheng X.: Structural basis for Klf4 recognition of methylated DNA., *Nucleic Acids Res.*, **42**(8), 4859–4867, 2014

[14] Aishima J.; Gitti R. K.; Noah J. E.; Gan H. H.; Schlick T.; Wolberger C.: A Hoogsteen base pair embedded in undistorted B-DNA., *Nucleic Acids Res.*, **30**(23), 5244–5252, 2002

[15] Carter M. E.; Brunet A.: Quick guide FOXO transcription factors, *Curr. Biol.*, **17**(4), 113–114, 2007

[16] Uhlenhaut N. H.; Treier M.: Forkhead transcription factors in ovarian function, *Reproduction*, **142**(4), 489–495, 2011

[17] Link W.: Introduction to FOXO biology, *Methods Mol. Biol.*, **1890**, 1–9, 2019

[18] Wang F.; Marshall C. B.; Ikura M.: Forkhead followed by disordered tail: The intrinsically disordered regions of FOXO3a, *Intrinsically Disord. Proteins*, **3**(1), 2015

[19] Galili N.; Davis R. J.; Fredericks W. J.; Mukhopadhyay S.; Rauscher F. J. 3rd; Emanuel B. S.; Rovera G.; Barr F. G.: Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma, *Nat. Genet.*, **5**(3), 230–235, 1993

[20] Zhang W.; Patil S.; Chauhan B.; Guo S.; Powell D. R.; Le J.; Klotsas A.; Matika R.; Xiao X.; Franks R.; Heidenreich K. A.; Sajan M. P.; Farese R. V.; Stolz D. B.; Tso P.; Koo S. H.; Montminy M.; Unterman T. G.: FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression, *J. Biol. Chem.*, **281**(15), 10105–10117, 2006

[21] Li Y.; Ma Z.; Jiang S.; Hu W.; Li T.; Di S.; Wang D.; Yang Y.: A global perspective on FOXO1 in lipid metabolism and lipid-related diseases, *Prog. Lipid. Res.*, **66**, 42–49, 2017

[22] Goto T.; Takano M.; Hirata J.; Tsuda H.: The involvement of FOXO1 in cytotoxic stress and drug-resistance induced by paclitaxel in ovarian cancers, *Br. J. Cancer*, **98**(6), 1068–1075, 2008

[23] Hillion J.; Le Coniat M.; Jonveaux P.; Berger R.; Bernard O. A.: AF6q21, a novel partner of the MLL gene in t(6;11)(q21;q23), defines a forkhead transcriptional factor subfamily, *Blood*, **90**(9), 3714–3719, 1997

[24] Calnan D. R.; Brunet A.: The FoxO code, *Oncogene*, **27**(16), 2276–2288 2008

[25] De Keizer P. L. J.; Burgering B. M. T.; Dansen T. B.: Forkhead box O as a sensor, mediator, and regulator of redox signaling, *Antioxid. Redox. Signal.*, **14**(6). 1093–1106, 2011

[26] Salcher S.; Hagenbuchner J.; Geiger K.; Seiter M. A.; Rainer J.; Kofler R.; Hermann M.; Kiechl-Kohlendorfer U.; Ausserlechner M. J.; Obexer P.: C10ORF10/DEPP, a transcriptional target of FOXO3, regulates ROS-sensitivity in human neuroblastoma, *Mol. Cancer*, **13**(1), 2014

[27] Borkhardt A.; Repp R.; Haas O. A.; Leis T.; Harbott J.; Kreuder J.; Hammermann J.; Henn T.; Lampert F.: Cloning and characterization of AFX, the gene that fuses to MLL in acute leukemias with a t(X;11)(q13;q23), *Oncogene*, **14**(2), 195–202, 1997

[28] Wang W.; Zhou P.-H.; Hu W.: Overexpression of FOXO4 induces apoptosis of clear-cell renal carcinoma cells through downregulation of Bim., *Mol. Med. Rep.*, **13**(3), 2229–2234, 2016

[29] Jiang S.; Yang Z.; Di S.; Hu W.; Ma Z.; Chen F.; Yang Y.: Novel role of forkhead box O 4 transcription factor in cancer: Bringing out the good or the bad, *Semin. Cancer Biol.*, **50**. 1–12, 2018

[30] Van Der Vos K. E.; Coffer P. J.: FOXO-binding partners: It takes two to tango, *Oncogene*, **27**(16), 2289–2299, 2008

[31] Brown A. K.; Webb A. E.: Regulation of FOXO Factors in Mammalian Cells, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **127**, 165–192, 2018

[32] Brownawell A. M.; Kops G. J. P. L.; Macara I. G.; Burgering B. M. T.: Inhibition of Nuclear Import by Protein Kinase B (Akt) Regulates the Subcellular Distribution and Activity of the Forkhead Transcription Factor AFX, *Mol. Cell. Biol.*, **21**(10), 3534–3546, 2001

[33] Obsilova V.; Vecer J.; Herman P.; Pabianova A.; Sulc M.; Teisinger J.; Boura E.; Obsil T.: 14-3-3 Protein interacts with nuclear localization sequence of forkhead transcription factor FoxO4, *Biochemistry*, **44**(34), 11608–11617, 2005

[34] Brunet A.; Kanai F.; Stehn J.; Xu J.; Sarbassova D.; Frangioni J. V.; Dalal S. N.; DeCaprio J. A.; Greenberg M. E.; Yaffe M. B.: 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport, *J. Cell Biol.*, **156**(5), 817–828, 2002

[35] Zhang X.; Gan L.; Pan H.; Guo S.; He X.; Olson S. T.; Mesecar A.; Adam S.; Unterman. T. G.: Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms: Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding, *J. Biol. Chem.*, **277**(47), 45276–45284, 2002

[36] Obsil T.; Ghirlando R.; Anderson D. E.; Hickman A. B.; Dyda F.: Two 14-3-3 Binding Motifs Are Required for Stable Association of Forkhead Transcription Factor FOXO4 with 14-3-3 Proteins and Inhibition of DNA Binding, *Biochemistry*, 42(51), 15264–15272, 2003

[37] Lehtinen M. K.; Yuan Z.; Boag P. R.; Yang Y.; Villén J.; Becker E. B. E.; DiBacco S.; de la Iglesia N.; Gygi S.; Blackwell T. K.; Bonni A.: A Conserved MST-FOXO Signaling Pathway Mediates Oxidative-Stress Responses and Extends Life Span, *Cell*, **125**(5), 987–1001, 2006

[38] Oh S. W.; Mukhopadhyay A.; Svrzikapa N.; Jiang F.; Davis R. J.; Tissenbaum H. A.: JNK regulates lifespan in Caenorhabiditis elegans by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**(12), 4494–4499, 2005

[39] Greer E. L.; Oskoui P. R.; Banko M. R.; Maniar J. M.; Gygi M. P.; Gygi S. P.; Brunet A.: The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor, *J. Biol. Chem.*, **282**(41), 30107–30119, 2007

[40] Fukuoka M.; Daitoku H.; Hatta M.; Matsuzaki H.; Umemura S.; Fukamizu A.: Negative regulation of forkhead transcription factor AFX (Foxo4) by CBP-induced acetylation., *Int. J. Mol. Med.*, **12**(4), 503–508, 2003

[41] Brunet A.; Sweeney L. B.; Sturgill J. F.; Chua K. F.; Greer P. L.; Lin Y.; Tran H.; Ross S. E.; Mostoslavsky R.; Cohen H. Y.; Hu L. S.; Cheng H.-L.; Jedrychowski M. P.; Gygi S. P.; Sinclair D. A.; Alt F. W.; Greenberg M. E.: Stress-Dependent Regulation of FOXO Transcription Factors by the SIRT1 Deacetylase, *Science*, **303**(5666), 2011–2015, 2004

[42] Matsuzaki H.; Daitoku H.; Hatta M.; Aoyama H.; Yoshimochi K.; Fukamizu A.: Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**(32), 11278–11283, 2005

[43] Tsai K. L.; Sun Y. J.; Huang C. Y.; Yang J. Y.; Hung M. C.; Hsiao C. D.: Crystal structure of the human FOXO3a-DBD/DNA complex suggests the effects of post-translational modification, *Nucleic Acids Res.*, **35**(20), 6984–6994, 2007

[44] Xie Q.; Chen J.; Yuan Z.: Post-translational regulation of FOXO, *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, **44**(11), 897–901, 2012

[45] Guttilla I. K.; White B. A.: Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells, *J. Biol. Chem.*, 284(35), 23204–23216, 2009

[46] Segura M. F.; Hanniford D.; Menendez S.; Reavie L.; Zou X.; Alvarez-Diaz S.; Zakrzewski J.; Blochin E.; Rose A.; Bogunovic D.; Polsky D.; Wei J.; Lee P.; Belitskaya-Levy I.; Bhardwaj N.; Osman I.; Hernando E.: Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**(6), 1814–1819, 2009

[47] Weigel D.; Jäckle H.: The fork head domain: A novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors?, *Cell*, **63**(3). 455–456, 1990

[48] Obsil T.; Obsilova V.: Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors, *Oncogene*, **27**(16). 2263–2275, 2008

[49] Obsil T.; Obsilova V.: Structural basis for DNA recognition by FOXO proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1813**(11), 1946–1953, 2011

[50] Brent M. M.; Anand R.; Marmorstein R.: Structural basis for DNA recognition by FoxO1 and its regulation by posttranslational modification, *Structure*, **16**(9), 1407–1416, 2008

[51] Boura E.; Rezabkova L.; Brynda J.; Obsilova V.; Obsil T.: Structure of the human FOXO4-DBD-DNA complex at 1.9 Å resolution reveals new details of FOXO binding to the DNA., *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **66**(12), 1351–1357, 2010

[52] Wang F.; Marshall C. B.; Yamamoto K.; Li G.-Y.; Plevin M. J.; You H.; Mak T. W.; Ikura M.: Biochemical and Structural Characterization of an Intramolecular Interaction in FOXO3a and Its Binding with p53, *J. Mol. Biol.*, **384**(3), 590–603, 2008

[53] Weigelt J.; Climent I.; Dahlman-Wright K.; Wikström M.: 1H, 13C and 15N resonance assignments of the DNA binding domain of the human forkhead transcription factor AFX., *J. Biomol. NMR*, **17**(2), 181–182, 2000

[54] Psenakova K.; Kohoutova K.; Obsilova V.; Ausserlechner M. J.; Veverka V.; Obsil T.: Forkhead Domains of FOXO Transcription Factors Differ in both Overall Conformation and Dynamics, *Cells*, **8**(9), 966, 2019

[55] Clark K. L.; Halay E. D.; Lai E.; Burley S. K.: Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5, *Nature*, **364**(6436), 412–420, 1993

[56] O'Brien R. M.; Granner D. K.: Regulation of gene expression by insulin, *Physiol. Rev.*, **76**(4), 1109–1161, 1996

[57] Singh P.; Han E. H.; Endrizzi J. A.; O'Brien R. M.; Chi Y.-I.: Crystal structures reveal a new and novel FoxO1 binding site within the human glucose-6-phosphatase catalytic subunit 1 gene promoter, *J. Struct. Biol.*, **198**(1), 54–64, 2017

[58] Chen Y.; Chen C.; Zhang Z.; Liu C.-C.; Johnson M. E.; Espinoza C. A.; Edsall L. E.; Ren B.; Zhou X. J.; Grant S. F. A.; Wells A. D.; Chen L.: DNA binding by FOXP3 domain-swapped dimer suggests mechanisms of long-range chromosomal interactions, *Nucleic Acids Res.*, **43**(2), 1268–1282, 2015

[59] Chen X.; Wei H.; Li J.; Liang X.; Dai S.; Jiang L.; Guo M.; Qu L.; Chen Z.; Chen L.; Chen Y.: Structural basis for DNA recognition by FOXC2, *Nucleic Acids Res.*, **47**(7), 3752–3764, 2019

[60] Furuyama T.; Nakazawa T.; Nakano I.; Mori N.: Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues, *Biochem J.*, **349**(2), 629–634, 2000

[61] Vacha P.; Zuskova I.; Bumba L.; Herman P.; Vecer J.; Obsilova V.; Obsil T.: Detailed Kinetic Analysis of the Interaction Between the FOXO4-DNA-binding Domain and DNA, *Biophys. Chem.*, **184**, 68–78, 2013

[62] Obsil T.; Obsilova V.: Structural basis for DNA recognition by FOXO proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1813**(11), 1946–1953, 2011

[63] Darnell J. E.: Transcription factors as targets for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer*, **2**(10), 740–749, 2002

[64] Hagenbuchner J.; Ausserlechner M. J.: Targeting transcription factors by small compounds - Current strategies and future implications, *Biochem. Pharmacol.*, **107**, 1–13, 2016

[65] Hegde N. S.; Sanders D. A.; Rodriguez R.; Balasubramanian S.: The transcription factor FOXM1 is a cellular target of the natural product thiostrepton, *Nat. Chem.*, **3**(9), 725–731, 2011

[66] Gormally M. V.; Dexheimer T. S.; Marsico G.; Sanders D. A.; Lowe C.; Matak-Vinkovi D.; Michael S.; Jadhav A.; Rai G.; Maloney D. J.; Simeonov A.; Balasubramanian S.: Suppression of the FOXM1 transcriptional programme via novel small molecule inhibition, *Nat. Commun.*, **5**, 5165, 2014

[67] Nagashima T.; Shigematsu N.; Maruki R.; Urano Y.; Tanaka H.; Shimaya A.; Shimokawa T.; Shibasaki M.: Discovery of novel forkhead box O1 inhibitors for

treating type 2 diabetes: Improvement of fasting glycemia in diabetic db/db mice, *Mol. Pharmacol.*, **78**(5), 961–970, 2010

[68] Zou P.; Liu L.; Zheng L.; Liu L.; Stoneman R. E.; Cho A.; Emery A.; Gilbert E. R.; Cheng Z.: Targeting FoxO1 with AS1842856 suppresses adipogenesis, *Cell Cycle*, **13**(23), 3759–3767, 2014

[69] Hagenbuchner J.; Obsilova V.; Kaserer T.; Kaiser N.; Rass B.; Psenakova K.; Docekal V.; Alblova M.; Kohoutova K.; Schuster D.; Aneichyk T.; Vesely J.; Obexer P.; Obsil T.; Ausserlechner M. J.: Modulating FOXO3 transcriptional activity by small, DBD-binding molecules, *Elife*, **8**(e48876), 2019

[70] Kohoutová K.: Studium interakcí nízkomolekulárních látek s DNA-vazebnou doménou forkhead transkripčního faktoru FOXO3, bakalářská práce, 2018

[71] Frangioni J. V.; Neel B. G.: Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins, *Anal. Biochem.*, **210**(1), 179–187, 1993

[72] Lawrence A. M.; Besir H.: Staining of proteins in gels with Coomassie G-250 without organic solvent and acetic acid, *J. Vis. Exp.*, **30**, 2009

[73] ExPASy - ProtParam tool [Online], [cit. 14.5.2020], dostupné z: https://web.expasy.org/protparam/

[74] Cavanagh J.; Fairbrother W. J.; Palmer A. G.; Skelton N. J.; Rance M.: Protein NMR Spectroscopy, Elsevier Inc., Amsterdam, 2007

[75] Lee W.; Tonelli M.; Markley J. L.: NMRFAM-SPARKY: enhanced software for biomolecular NMR spectroscopy, *Bioinformatics*, **31**(8), 1325–1327, 2015

[76] Spectrum Descriptions | Protein NMR [Online], [cit. 21.5.2020], dostupné z: https://www.protein-nmr.org.uk/solution-nmr/spectrum-descriptions/

[77] Kay L. E.; Ikura M.; Tschudin R.; Bax A.: Three-dimensional triple-resonance NMR spectroscopy of izotopically enriched proteins, *J. Magn. Reson.*, **89**(3), 496–514, 1990

[78] Clubb R. T.; Thanabal V.; Wagner G.: A constant-time three-dimensional triple-resonance pulse scheme to correlate intraresidue 1HN, 15N, and 13C′ chemical shifts in 15N13C-labelled proteins, *J. Magn. Reson.*, **97**(1), 213–217, 1992

[79] Grzesiekt S.; Bax A.: Correlating Backbone Amide and Side Chain Resonances in Larger Proteins by Multiple Relayed Triple Resonance NMR, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**(16), 6291–6293, 1992

[80] Grzesiek S.; Bax A.: Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly 13C/15N-enriched proteins, *J. Biomol. NMR*, **3**(2), 185–204, 1993

[81] Bax A.; Clore G. M.; Gronenborn A. M.: 1H1H correlation via isotropic mixing of 13C magnetization, a new three-dimensional approach for assigning 1H and 13C spectra of 13C-enriched proteins, *J. Magn. Reson.*, **88**(2), 425–431, 1990

[82] Grzesiek S.; Anglister J.; Bax A.: Correlation of Backbone Amide and Aliphatic Side-Chain Resonances in 13C/15N-Enriched Proteins by Isotropic Mixing of 13C Magnetization, *J. Magn. Reson.*, **101**(1), 114–119, 1993

[83] Marion D.; Driscoll P. C.; Kay L. E.; Wingfield P. T.; Bax A.; Gronenborn A. M.; Clore G. M.: Overcoming the Overlap Problem in the Assignment of 1H NMR Spectra of Larger Proteins by Use of Three-Dimensional Heteronuclear 1H-15N Hartmann-Hahn-Multiple Quantum Coherence and Nuclear Overhauser-Multiple Quantum Coherence Spectroscopy: Application to Interleukin 1β, *Biochemistry*, **28**(15), 6150–6156, 1989

[84] Fesik S. W.; Zuiderweg E. R. P.: Heteronuclear three-dimensional nmr spectroscopy. A strategy for the simplification of homonuclear two-dimensional NMR spectra, *J. Magn. Reson.*, **78**(3), 588–593, 1988

[85] Shen Y.; Delaglio F.; Cornilescu G.; Bax A.: TALOS+: A hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts, *J. Biomol. NMR*, **44**(4), 213–223, 2009

[86] Ramachandranův diagram – Wikipedie [Online], [cit. 22.5.2020], dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Ramachandranův_diagram#/media/Soubor:Protein_backbone_PhiPsiOmega_drawing.svg

[87] Seeing Molecules With Nuclear Magnetic Resonance [Online], [cit. 22.5.2020], dostupné z: http://fbreagents.com/basics_nmr/9proteins.htm

[88] Herrmann T.; Güntert P.; Wüthrich K.: Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle dynamics algorithm DYANA, *J. Mol. Biol.*, **319**(1), 209–227, 2002

[89] Güntert P.; Wüthrich K.: Improved efficiency of protein structure calculations from NMR data using the program DIANA with redundant dihedral angle constraints., *J. Biomol. NMR*, **1**(4), 447–456, 1991

[90] Harjes E.; Harjes S.; Wohlgemuth S.; Müller K.-H.; Krieger E.; Herrmann C.; Bayer P.: GTP-Ras Disrupts the Intramolecular Complex of C1 and RA Domains of Nore1, *Structure*, **14**(5), 881–888, 2006

[91] Williamson M. P.: Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding., *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **73**, 1–16, 2013

[92] Schumann F. H.; Riepl H.; Maurer T.; Gronwald W.; Neidig K. P.; Kalbitzer H. R.: Combined chemical shift changes and amino acid specific chemical shift mapping of protein-protein interactions, *J. Biomol. NMR*, **39**(4), 275–289, 2007

[93] GLYCOPEDIA [Online]. [cit. 03.1.2020], dostupné z: https://glycopedia.eu/e-chapters/NMR-for-Structural-Glycoscience-35/Saturation-Transfer-Difference

[94] Gaillard T.: Evaluation of AutoDock and AutoDock Vina on the CASF-2013 Benchmark, *J. Chem. Inf. Model.*, **58**(8), 1697–1706, 2018

[95] Trott O.; Olson A. J.: AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J. Comput. Chem.*, **31**(2), 455–461, 2010

[96] Morris G. M.; Huey R.; Lindstrom W.; Sanner M. F.; Belew R. K.; Goodsell D. S.; Olson A. J.: AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.*, **30**(16), 2785–2791, 2009

[97] The Human Protein Atlas [Online], [cit. 06.6.2020], dostupné z: https://www.proteinatlas.org/

[98] GenScript - Make Research Easy - The leader in molecular cloning and gene synthesis, peptide synthesis, protein and antibody engineering, [Online], [cit. 06.6.2020], dostupné z: https://www.genscript.com/gsfiles/vector-map/bacteria/pGEX-6P-1.pdf?1081179290

10 Přílohy

Seznam příloh

Obr. 10.1 Tkáňová specifita FOXO proteinů. 104

10.2 Mapa plazmidu a sekvence proteinů 105

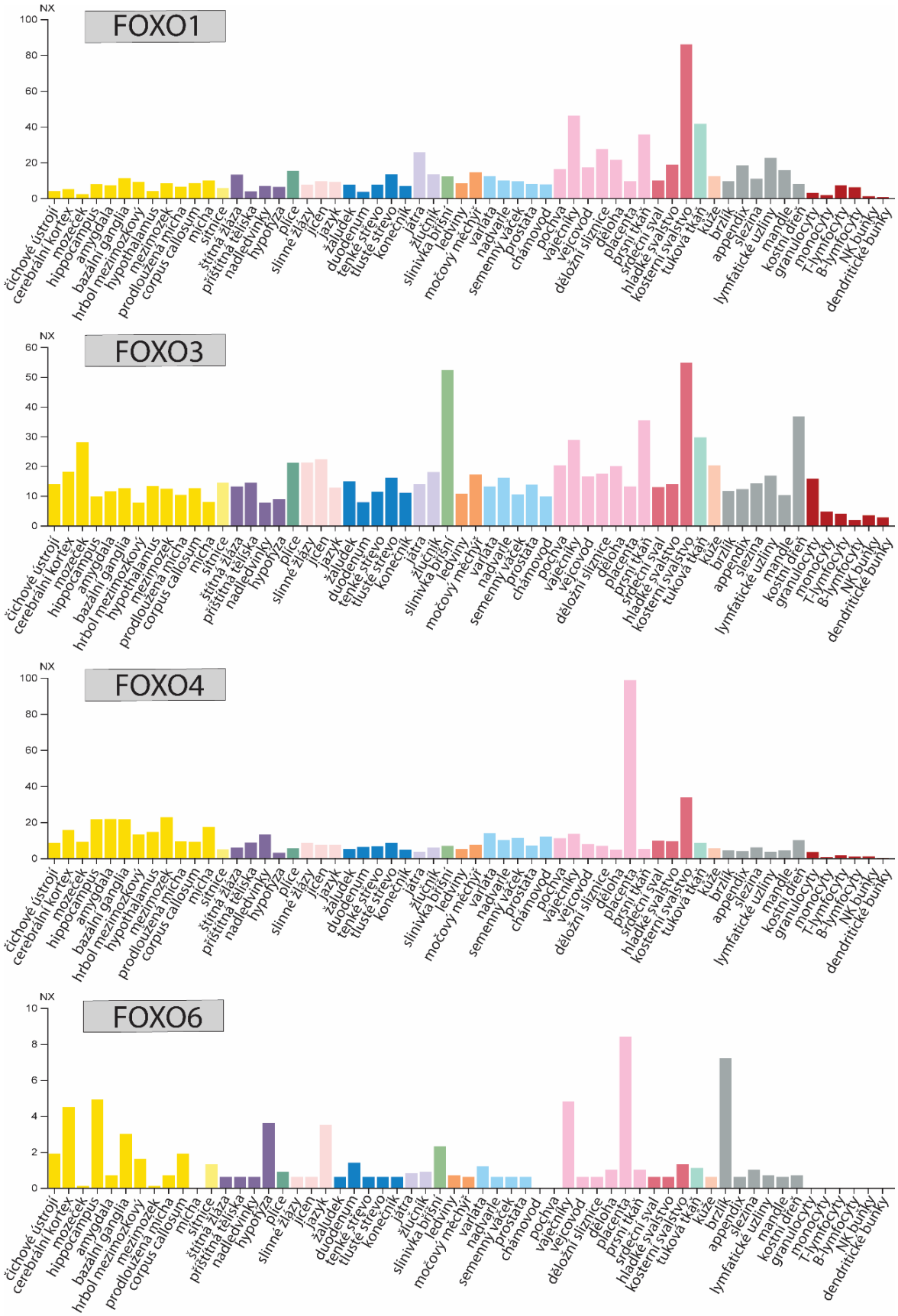
10.3 Tabulky se složením použitých roztoků a pufrů 106

10.4 ^{1}H-^{15}N HSQC spektra 110

10.5 STD spektra 115

10.6 Validační zpráva ke struktuře DBD FOXO1 120

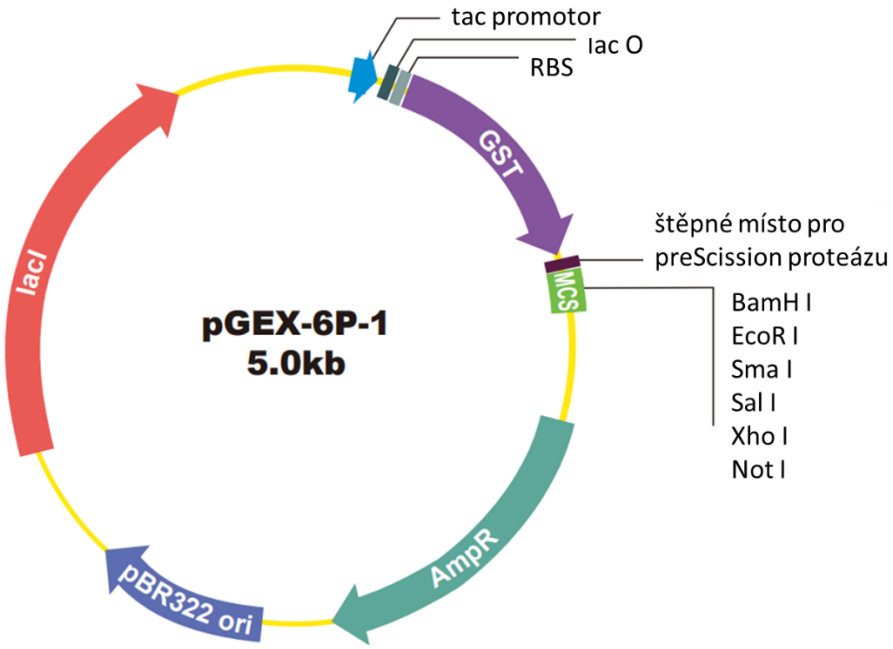
10.7 Publikace "Forkhead Domains of FOXO Transcription Factors Differ in both Overall Conformation and Dynamics" 149



Obr. 10.1 Tkáňová specifita FOXO proteinů.

Normalizovaná úroveň exprese (NX) v 55 druzích tkáně a 6 typech krevních buněk. Normalizovaná data byla získána na základě tří transkriptomických metod (HPA, GTE a FANTOM5). Funkčně související typy tkání jsou vyznačeny stejnou barvou. Obrázky byly převzaty a upraveny z [97].

10.2 Mapa plazmidu a sekvence proteinů



Obr. 10.2 Mapa plazmidu pGEX-6P-1. Obrázek byl převzat a upraven z [98].

Sekvence DBD myšího proteinu FOXO1 (residua 156–269)

GPLGSAWGNLSYADLITKAIESSAEKRLTLSQIYEWMVKSVPYFKDKGDSNSSAG WKNSIRHNLSLHSKFIRVQNEGTGKSSWWMLNPEGGKSGKSPRRRAASMDNNS KFAKSR**G(S)**RAAK

M_r = 13 192, ε_{280} = 31 970*

Pozůstatek GST afinitní kotvy po jejím odštěpení je podtržen. Jediný rozdíl v sekvenci lidského a myšího FOXO1 je zvýrazněn tučně, v závorce je aminokyselina přítomná v lidské sekvenci.

*Oba parametry byly získány pomocí programu ProtParam dospupném z [73].

Sekvence DBD lidského proteinu FOXO3 (residua 156–269)

GPLGSAWGNLSYADLITRAIESSPDKRLTLSQIYEWMVRCVPYFKDKGDSNSSAG WKNSIRHNLSLHSRFMRVQNEGTGKSSWWIINPDGGKSGKAPRRRAVSMDNSN KYTKSRGRAAK

M_r = 13 348, ε_{280} = 33 460*

Pozůstatek GST afinitní kotvy po jejím odštěpení je podtržen.

*Oba parametry byly získány pomocí programu ProtParam dostupném z [73].

10.3 Tabulky se složením použitých roztoků a pufrů

Tabulka 10.1 – Složení LB média, 1 l

Chemikálie	Odměřené množství
trypton	10 g
NaCl	10 g
kvasinkový extrakt	5 g

Tabulka 10.2 – Složení lyzačního pufru, 100 ml

Chemikálie	Odměřené množství
10x PBS (složení viz Tabulka 10.3)	20 ml
1,4-dithiothreitol	0,154 g
0,5M roztok EDTA (pH = 8)	200 µl

Tabulka 10.3 – Složení 10x koncentrovaného PBS pufru, 1l

Chemikálie	Odměřené množství
NaCl	80 g
KCl	2 g
KH_2PO_4	2,4 g
$NaHPO_4 \cdot 2H_2O$	14,4 g
NaN_3	0,4 g

Tabulka 10.4 – Složení roztoku 1 pro minimální média obohacená podle V. Veverky, 1 l

Chemikálie	Odměřené množství
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	89 g
KH_2PO_4	30 g
NaCl	5 g

Tabulka 10.5 – Složení roztoku 2 pro minimální média obohacená podle V. Veverky

Chemikálie	Odměřené množství
$Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$	1,93 g
dH_2O	20 ml

Tabulka 10.6 – Složení roztoku 3 pro minimální média obohacená podle V. Veverky, 200 ml

Chemikálie	Odměřené množství
EDTA (rozpuštěno ve 160 ml dH_2O, pH upraveno na 7)	1 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,5 g
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16 g
$ZnCl_2$	10 mg
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	2,5 mg
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	3,7 mg
H_3BO_3	2 mg

Tabulka 10.7 – Složení roztoku 4 pro minimální média obohacená podle V. Veverky

Chemikálie	Odměřené množství
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	4,9 g
dH_2O	20 ml

Tabulka 10.8 – Složení roztoku 5 pro minimální média obohacená podle V. Veverky

Chemikálie	Odměřené množství
$CaCl_2$	0,66 g
dH_2O	20 ml

Tabulka 10.9 – Složení roztoku 6 pro minimální média podle V. Veverky

Chemikálie	Odměřené množství
D-biotin	10 mg
50% roztok ethanolu v dH_2O	10 ml

Tabulka 10.10 – Složení roztoku 7 pro minimální média podle V. Veverky

Chemikálie	Odměřené množství
thiamin	10 mg
dH_2O	10 ml

Tabulka 10.11 – Složení pufru pro GST chromatografii, 500 ml

Chemikálie	Odměřené množství
1M roztok Tris-HCl pufru (pH = 7,5)	10 ml
NaCl	15 g
0,5M roztok EDTA	1 ml
1,4-dithiothreitol	0,78 g
glycerol	50 g

Tabulka 10.12 – Složení elučního roztoku pro GST chromatografii, pH = 8

Chemikálie	Odměřené množství
pufr pro GST chr. (viz Tabulka 10.11)	60 ml
glutathion	0,186 g

Tabulka 10.13 – Složení pufru pro dialýzu, 1 l

Chemikálie	Odměřené množství
1M roztok Tris-HCl pufru (pH = 7,5)	20 ml
NaCl	5,8 g
0,5M roztok EDTA	2 ml
1,4-dithiothreitol	0,154 g
glycerol	100 g

Tabulka 10.14 – Složení Tris-HCl pufru pro gelovou permeační chromatografii, 1 l

Chemikálie	Odměřené množství
NaCl	5,8 g
1M roztok Tris-HCl pufru (pH = 7,5)	50 ml
1,4-dithiothreitol	0,154 g
glycerol	100 g

Tabulka 10.15 – Složení pufru pro 4% zaváděcí gel

Chemikálie	Odměřené množství
1M Tris-HCl pufr (pH = 6,8)	50 ml
10% SDS	4 ml
dH_2O	46 ml

Tabulka 10.16 – Složení 4% zaváděcího gelu pro SDS-PAGE

Chemikálie	Odměřené množství
Rotiphorese Gel 30 pcpc	0,25 ml
pufr pro 4% zaváděcí gel (viz tab 10.15, str. 105)	465 µl
dH_2O	1,125 ml
10% persulfát amonný	25 µl
TEMED	7,5 µl

Tabulka 10.17 – Složení 15% polyakrylamidového separačního gelu pro SDS-PAGE

Chemikálie	Odměřené množství
Rotiphorese Gel 30	1,875 ml
pufr pro 15% separační gel (viz tab. 10.18)	0,95 ml
dH_2O	0,875 ml
10% persulfát amonný	25 µl
TEMED	10 µl

Tabulka 10.18 – Složení pufru pro 15% separační gel

Chemikálie	Odměřené množství
2M Tris-HCl pufr (pH = 8,8)	75 ml
10% SDS	4 ml
dH_2O	21 ml

Tabulka 10.19 – Složení pufru pro SDS elektroforézu, 10x, 1 l

Chemikálie	Odměřené množství
Tris	30 g
glycin	144 g
SDS	10 g

Tabulka 10.20 – Složení pufru pro přípravu vzorků, 5x

Chemikálie	Odměřené množství
1M Tris-HCl (pH = 6,8)	0,6 ml
50% glycerol	5 ml
10% SDS	2 ml
β-merkaptoethanol	0,5 ml
1% bromfenolová modř	1 ml
dH_2O	0,9 ml

Tabulka 10.21 – Složení barvícího roztoku pro vizualizaci polyakrylamidových gelů pomocí, 1l

Chemikálie	Odměřené množství
CBB G-250	80 mg
35% HCl	3 ml

Tabulka 10.22 – Složení 20mM fosfátového pufru pro NMR měření, pH = 6,5, 1 l

Chemikálie	Odměřené množství
KCl	3,73 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	2,14 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	2,26 g

Tabulka 10.23 – Složení vzorkového pufru pro nativní elektroforézu, 10 ml

Chemikálie	Odměřené množství
TBE pufr 10x (viz tab. 10.25)	1 ml
bromfenolová modř	10 mg
glycerol	3 ml

Tabulka 10.24 – Složení 12% polyakrylamidového gelu pro nativní elektroforézu

Chemikálie	Odměřené množství
TBE pufr 10x (viz tab. 10.25)	0,60 ml
Rotiphorese Gel 30	3,40 ml
dH_2O	2,97 ml
10% APS	30,0 µl
TEMED	7,5 µl

Tabulka 10.25 – Složení TBE pufru 10x, 1l

Chemikálie	Odměřené množství
Tris	108 g
H_3BO_3	55 g
0,5M roztok EDTA (pH = 8)	40 ml

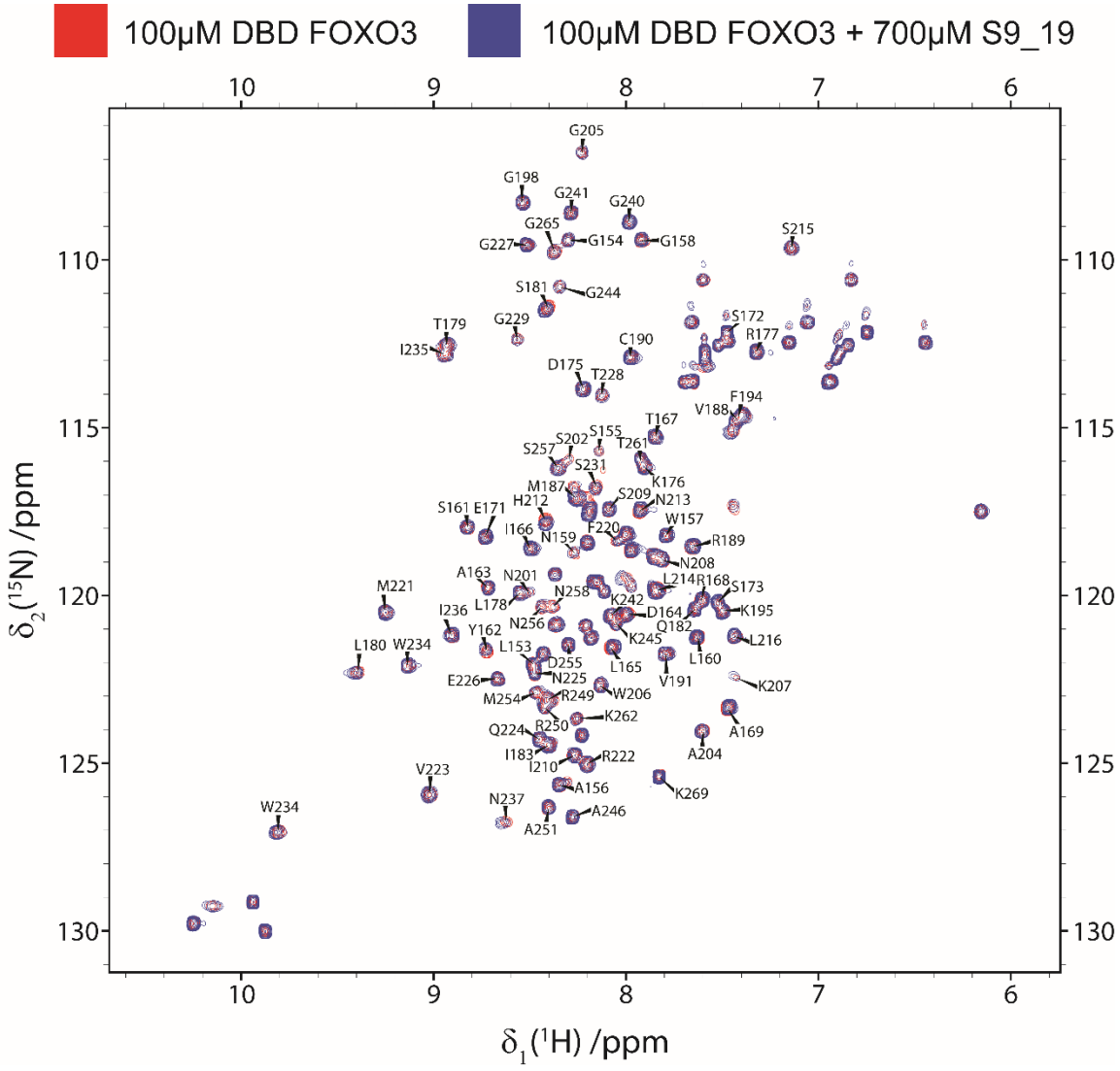
Tabulka 10.26 – Složení fosfátového pufru pro NMR měření FOXO1, pH = 6,5, 0,5 l

Chemikálie	Odměřené množství
KCl	1,87 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	1,07 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	1,13 g
SIGMA*FAST*™	5 tabletek

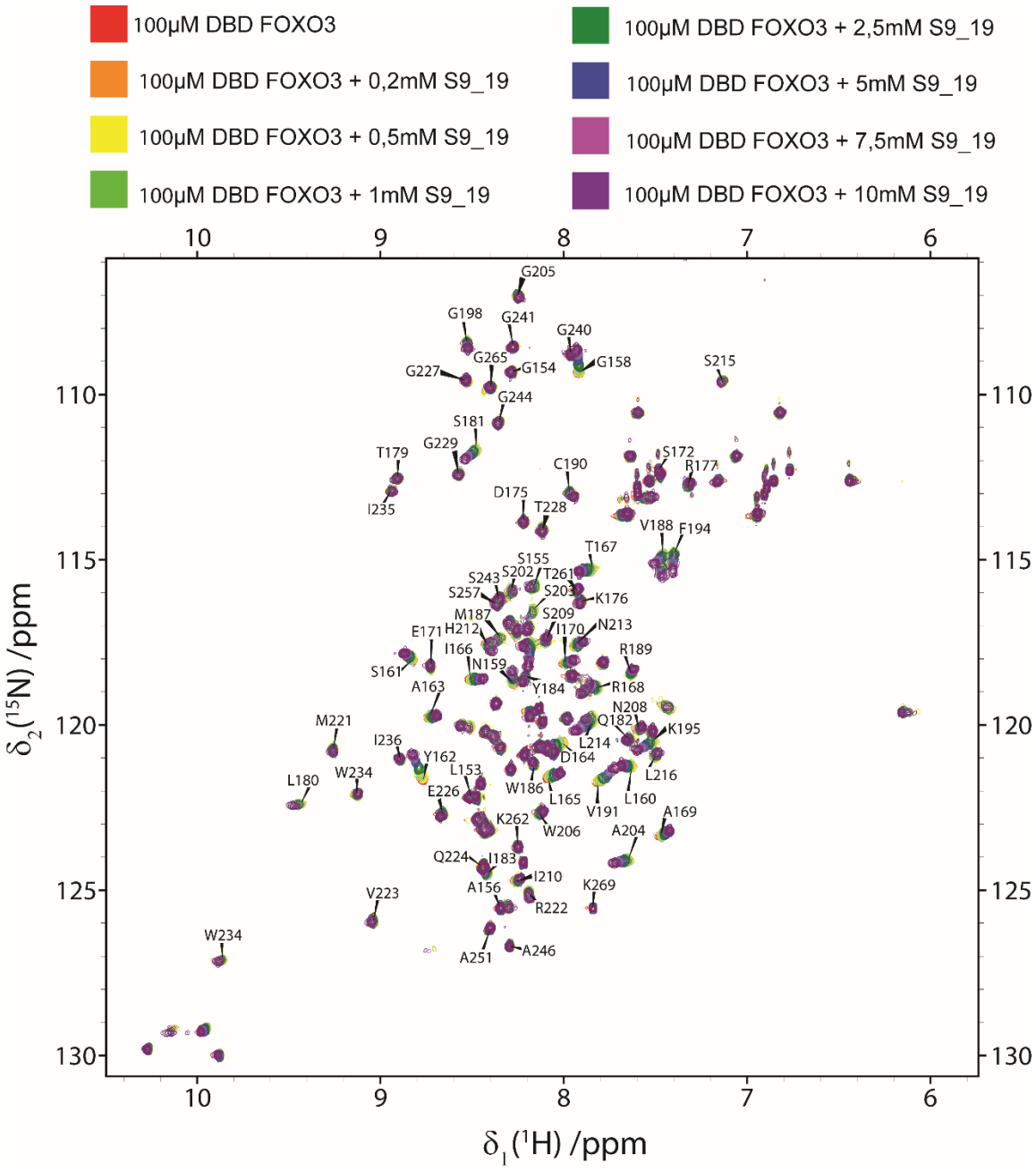
Tabulka 10.27 – Složení 100mM fosfátového pufru, pH = 6,5, 1 l

Chemikálie	Odměřené množství
KCl	3,73 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	10,7 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	11,3 g

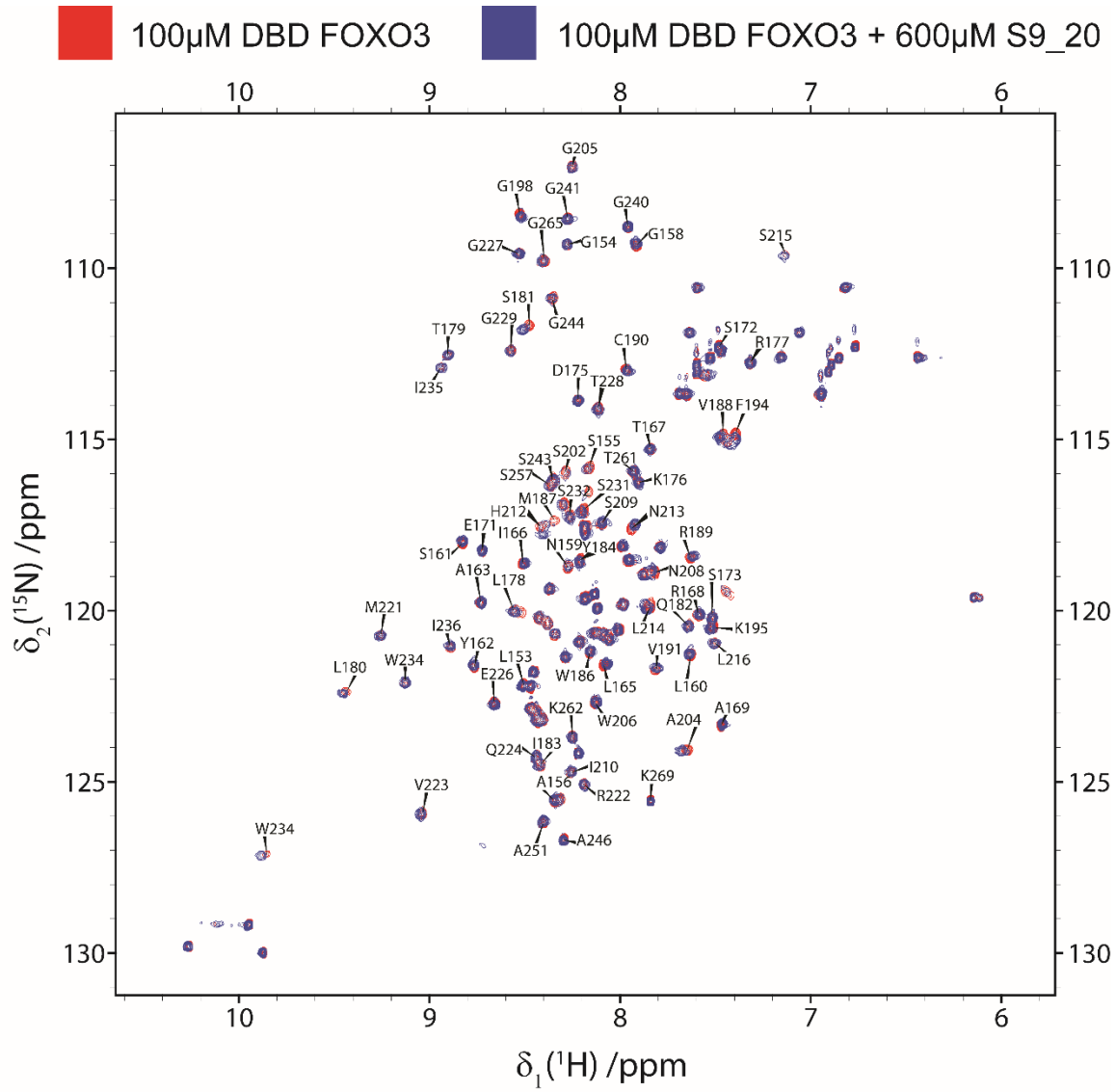
10.4 ^{1}H-^{15}N HSQC spektra



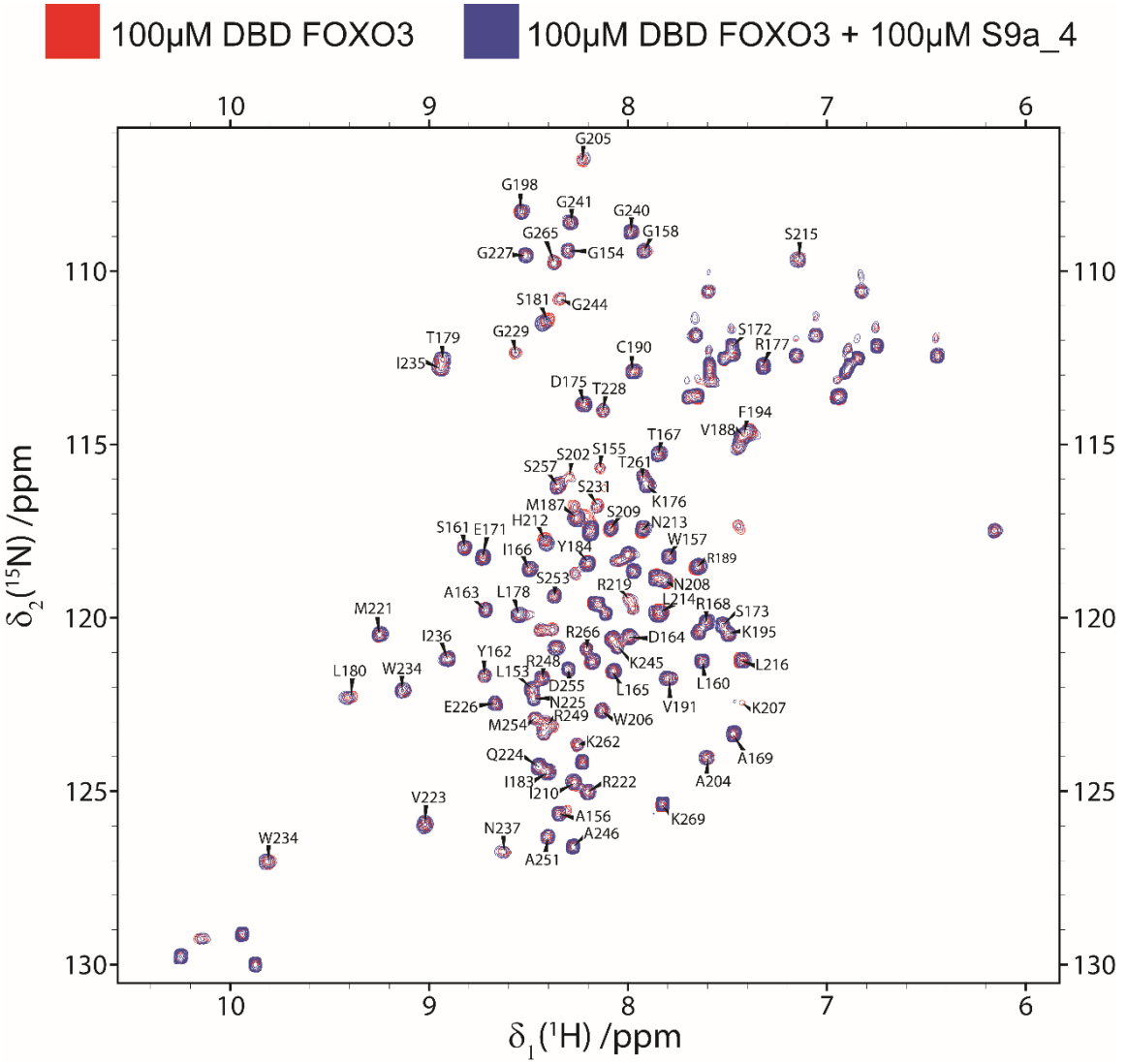
Obr. 10.3 ^{1}H-^{15}N HSQC experiment se 700μM sloučeninou S9_19. Na obrázku jsou překryta ^{1}H-^{15}N HSQC spektra DBD FOXO3, červeně spektrum proteinu, modře spektrum proteinu s přídavkem sloučeniny S9_19. Obrázek byl vyvořen v programu Adobe Illustrator CC, v. 23.0.2, Adobe Inc.



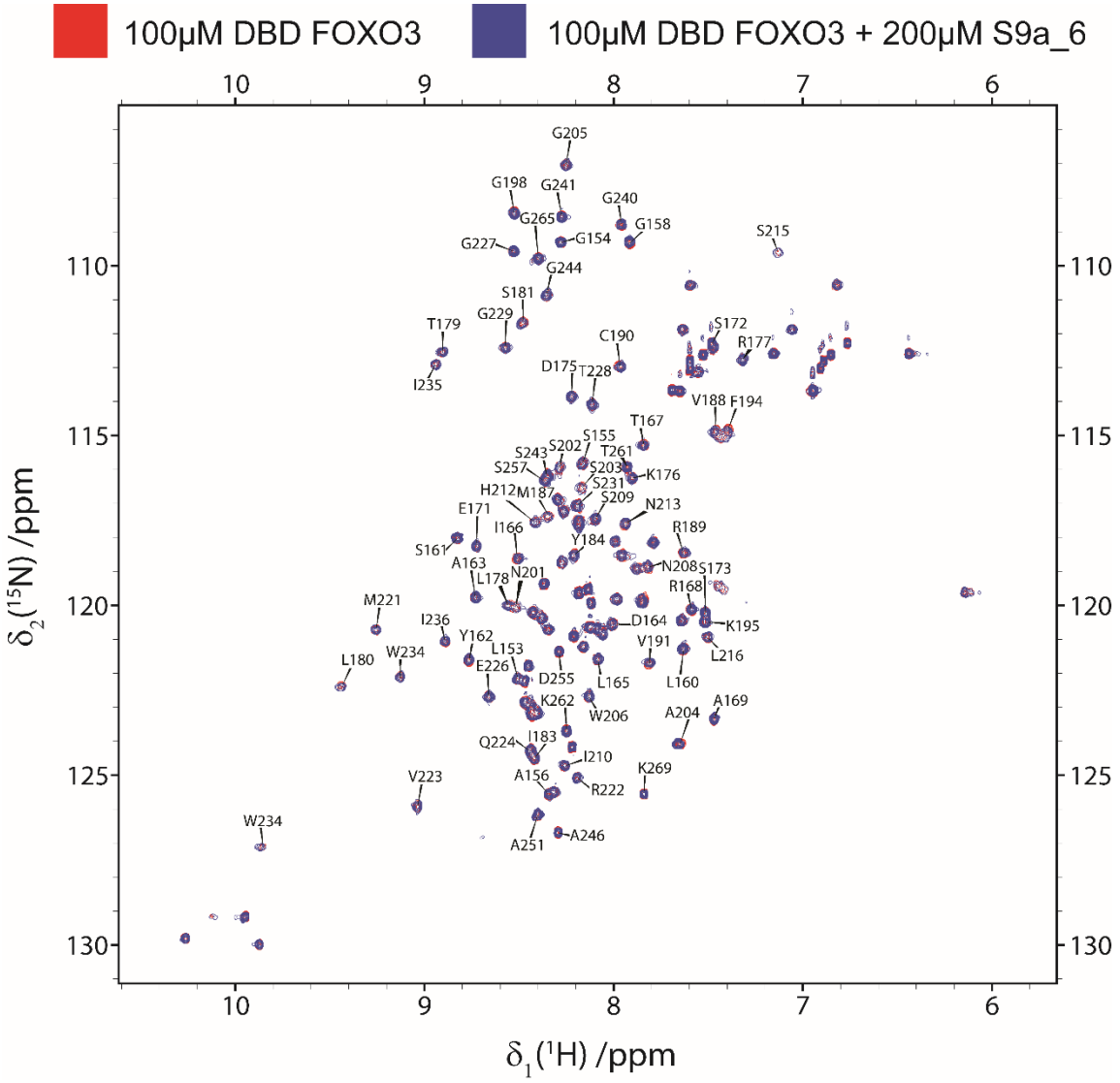
Obr. 10.4 ^{1}H-^{15}N HSQC experiment, titrace sloučeninou S9_19. Na obrázku jsou překryta ^{1}H-^{15}N HSQC spektra DBD FOXO3. Obrázek byl vyvořen v programu Adobe Illustrator CC, v. 23.0.2, Adobe Inc.



Obr. 10.5 ^{1}H-^{15}N HSQC experiment s 600μM sloučeninou S9_20. Na obrázku jsoupřekryta ^{1}H-^{15}N HSQC spektra DBD FOXO3, červeně spektrum proteinu, modře spektrum proteinu s přídavkem sloučeniny S9_20. Obrázek byl vyvořen v programu Adobe Illustrator CC, v. 23.0.2, Adobe Inc.

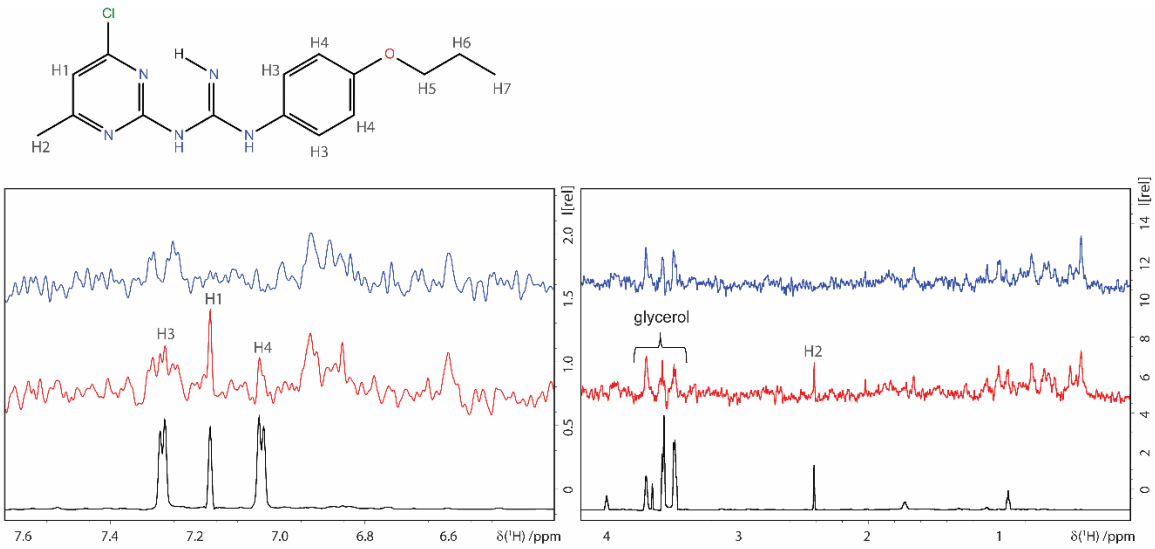


Obr. 10.6 ^{1}H-^{15}N HSQC experiment se 100μM sloučeninou S9a_4. Na obrázku jsou překryta ^{1}H-^{15}N HSQC spektra DBD FOXO3, červeně spektrum proteinu, modře spektrum proteinu s přídavkem sloučeniny S9a_4. Obrázek byl vyvořen v programu Adobe Illustrator CC, v. 23.0.2, Adobe Inc.

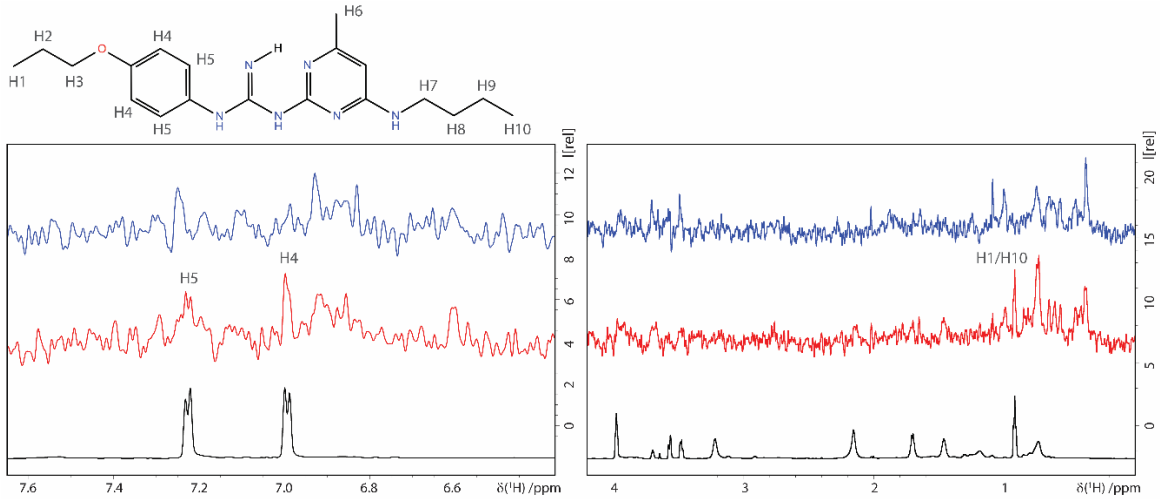


Obr. 10.7 ^{1}H-^{15}N HSQC experiment s 200μM sloučeninou S9a_6. Na obrázku jsoupřekryta ^{1}H-^{15}N HSQC spektra DBD FOXO3, červeně spektrum proteinu, modře spektrum proteinu s přídavkem sloučeniny S9a_6. Obrázek byl vyvořen v programu Adobe Illustrator CC, v. 23.0.2, Adobe Inc.

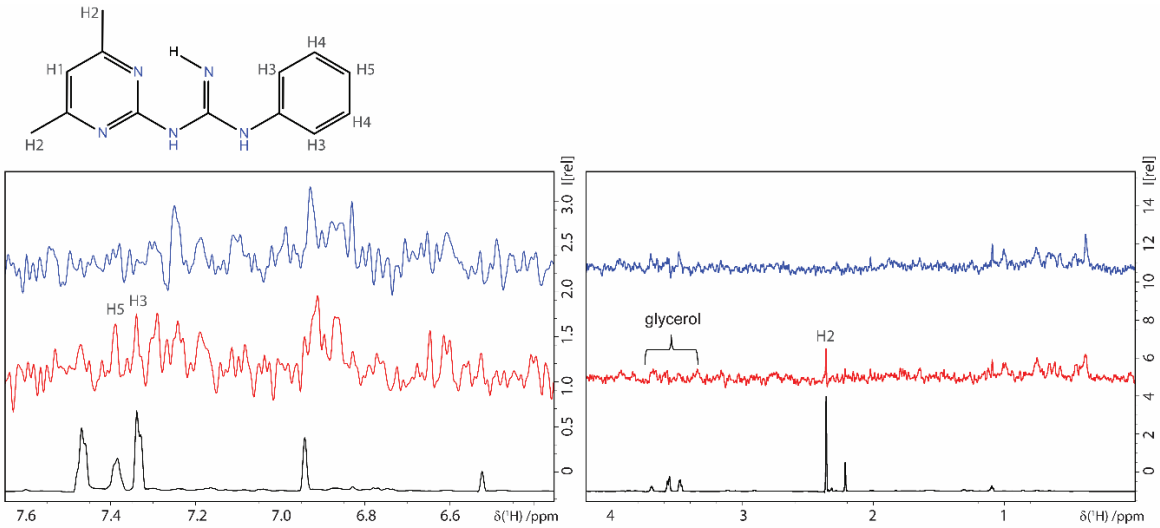
10.5 STD spektra



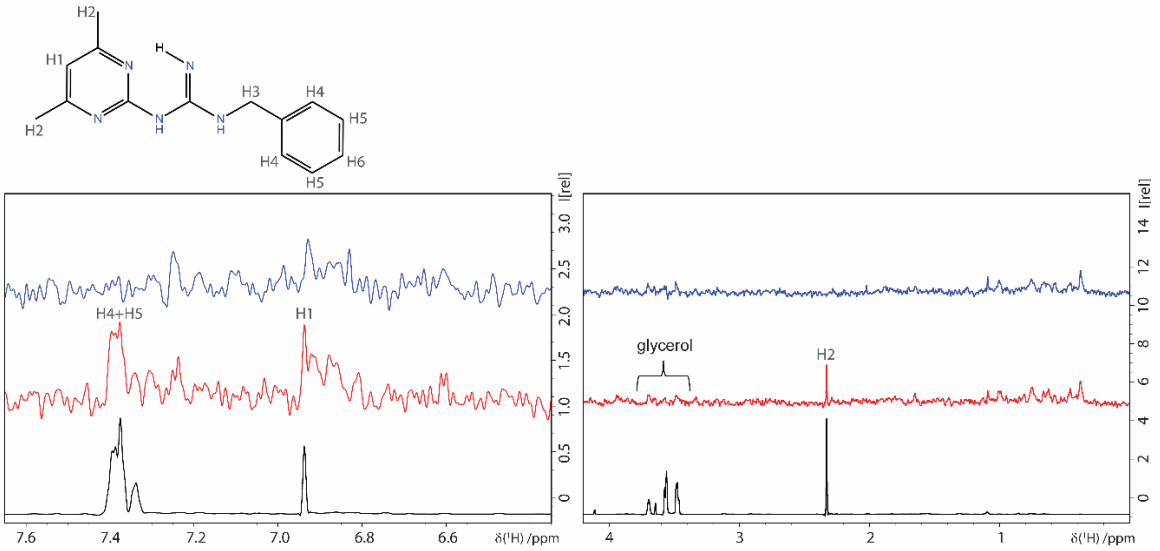
Obr. 10.8 STD experiment se sloučeninou S9a_2. Černě ^{1}H spektrum s nezměněnými intenzitami signálů. Modře kontrolní STD experiment – STD experiment se samotnou DBD FOXO3. Červeně STD experiment se sloučeninou S9a_2. Obrázek byl vyvořen v programu Adobe Illustrator CC, v. 23.0.2, Adobe Inc.



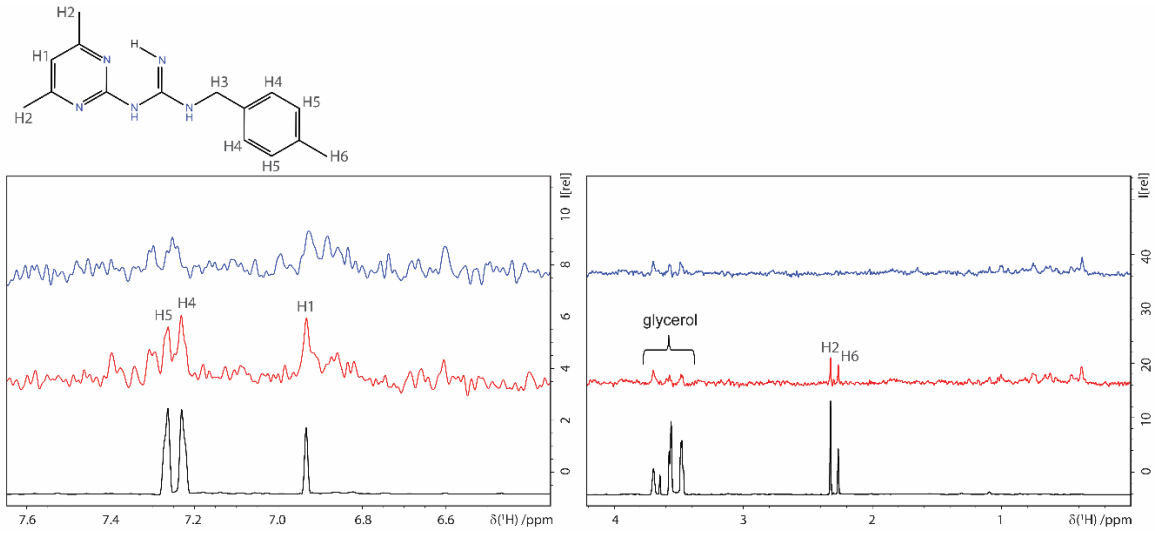
Obr. 10.9 STD experiment se sloučeninou S9a_5. Černě ^{1}H spektrum s nezměněnými intenzitami signálů. Modře kontrolní STD experiment – STD experiment se samotnou DBD FOXO3. Červeně STD experiment se sloučeninou S9a_5. Obrázek byl vyvořen v programu Adobe Illustrator CC, v. 23.0.2, Adobe Inc.



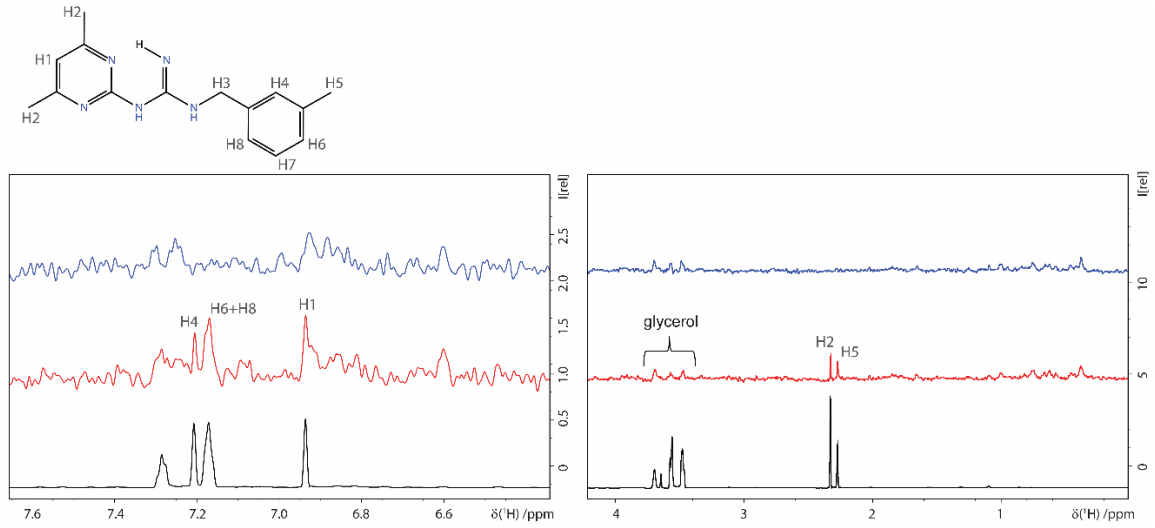
Obr. 10.10 STD experiment se sloučeninou S9_2. Černě ^{1}H spektrum s nezměněnými intenzitami signálů. Modře kontrolní STD experiment – STD experiment se samotnou DBD FOXO3. Červeně STD experiment se sloučeninou S9_2. Obrázek byl vyvořen v programu Adobe Illustrator CC, v. 23.0.2, Adobe Inc.



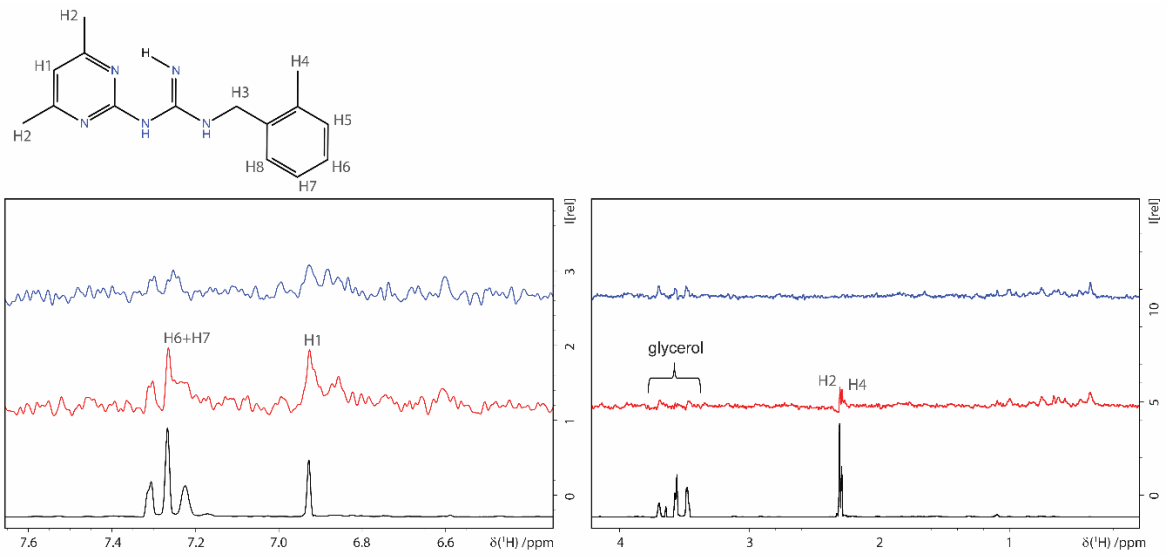
Obr. 10.11 STD experiment se sloučeninou S9_10. Černě ^{1}H spektrum s nezměněnými intenzitami signálů. Modře kontrolní STD experiment – STD experiment se samotnou DBD FOXO3. Červeně STD experiment se sloučeninou S9_10. Obrázek byl vyvořen v programu Adobe Illustrator CC, v. 23.0.2, Adobe Inc.



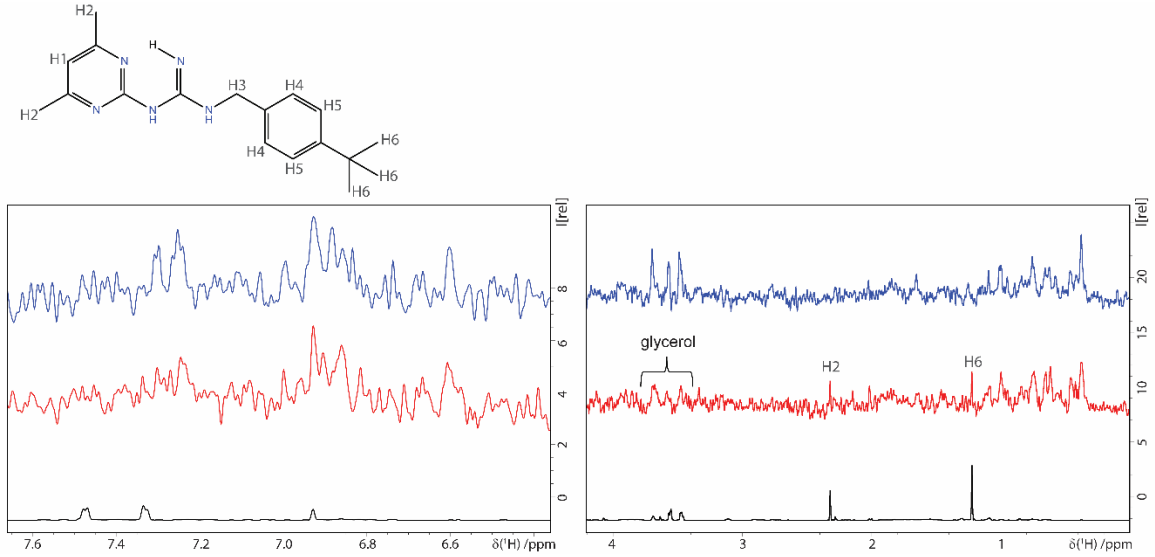
Obr. 10.12 STD experiment se sloučeninou S9_14. Černě ^{1}H spektrum s nezměněnými intenzitami signálů. Modře kontrolní STD experiment – STD experiment se samotnou DBD FOXO3. Červeně STD experiment se sloučeninou S9_14. Obrázek byl vyvořen v programu Adobe Illustrator CC, v. 23.0.2, Adobe Inc.



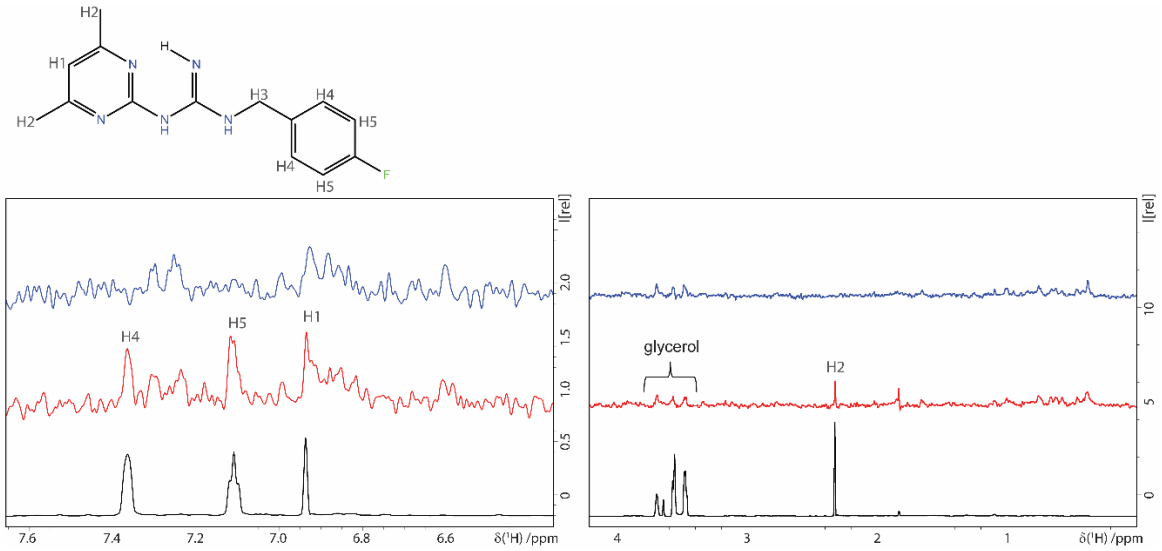
Obr. 10.13 STD experiment se sloučeninou S9_15. Černě ^{1}H spektrum s nezměněnými intenzitami signálů. Modře kontrolní STD experiment – STD experiment se samotnou DBD FOXO3. Červeně STD experiment se sloučeninou S9_15. Obrázek byl vyvořen v programu Adobe Illustrator CC, v. 23.0.2, Adobe Inc.



Obr. 10.14 STD experiment se sloučeninou S9_16. Černě ^{1}H spektrum s nezměněnými intenzitami signálů. Modře kontrolní STD experiment – STD experiment se samotnou DBD FOXO3. Červeně STD experiment se sloučeninou S9_16. Obrázek byl vyvořen v programu Adobe Illustrator CC, v. 23.0.2, Adobe Inc.



Obr. 10.15 STD experiment se sloučeninou S9_17. Černě ^{1}H spektrum s nezměněnými intenzitami signálů. Modře kontrolní STD experiment – STD experiment se samotnou DBD FOXO3. Červeně STD experiment se sloučeninou S9_17. Obrázek byl vyvořen v programu Adobe Illustrator CC, v. 23.0.2, Adobe Inc.



Obr. 10.16 STD experiment se sloučeninou S9_18. Černě ^{1}H spektrum s nezměněnými intenzitami signálů. Modře kontrolní STD experiment – STD experiment se samotnou DBD FOXO3. Červeně STD experiment se sloučeninou S9_18. Obrázek byl vyvořen v programu Adobe Illustrator CC, v. 23.0.2, Adobe Inc.

10.6 Validační zpráva ke struktuře DBD FOXO1

Full wwPDB NMR Structure Validation Report

Aug 31, 2019 – 10:09 PM EDT

PDB ID	:	6QVW
Title	:	Solution structure of the free FOXO1 DNA binding domain
Authors	:	Psenakova, K.; Obsil, T.; Veverka, V.; Obsilova, V.; Kohoutova, K.
Deposited on	:	2019-03-05

This is a Full wwPDB NMR Structure Validation Report for a publicly released PDB entry.

We welcome your comments at *validation@mail.wwpdb.org*
A user guide is available at
https://www.wwpdb.org/validation/2017/NMRValidationReportHelp
with specific help available everywhere you see the (i) symbol.

The following versions of software and data (see references (i)) were used in the production of this report:

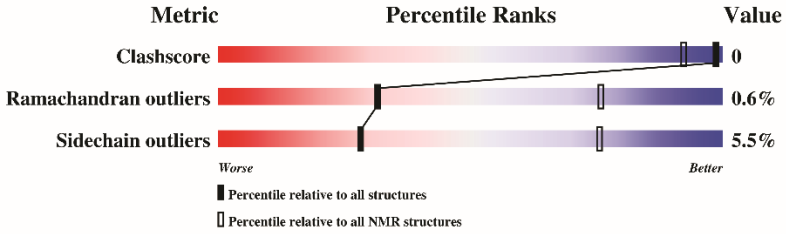
Cyrange	:	Kirchner and Güntert (2011)
NmrClust	:	Kelley et al. (1996)
MolProbity	:	4.02b-467
Percentile statistics	:	20171227.v01 (using entries in the PDB archive December 27th 2017)
RCI	:	v_1n_11_5_13_A (Berjanski et al., 2005)
PANAV	:	Wang et al. (2010)
ShiftChecker	:	2.4
Ideal geometry (proteins)	:	Engh & Huber (2001)
Ideal geometry (DNA, RNA)	:	Parkinson et al. (1996)
Validation Pipeline (wwPDB-VP)	:	2.4

1 Overall quality at a glance (i)

The following experimental techniques were used to determine the structure:
SOLUTION NMR

The overall completeness of chemical shifts assignment is 64%.

Percentile scores (ranging between 0-100) for global validation metrics of the entry are shown in the following graphic. The table shows the number of entries on which the scores are based.



Metric	Whole archive (#Entries)	NMR archive (#Entries)
Clashscore	136327	12091
Ramachandran outliers	132723	10835
Sidechain outliers	132532	10811

The table below summarises the geometric issues observed across the polymeric chains and their fit to the experimental data. The red, orange, yellow and green segments indicate the fraction of residues that contain outliers for >=3, 2, 1 and 0 types of geometric quality criteria. A cyan segment indicates the fraction of residues that are not part of the well-defined cores, and a grey segment represents the fraction of residues that are not modelled. The numeric value for each fraction is indicated below the corresponding segment, with a dot representing fractions <=5%

Mol	Chain	Length	Quality of chain
1	A	119	58% · 39%

2 Ensemble composition and analysis

This entry contains 30 models. Model 12 is the overall representative, medoid model (most similar to other models). The authors have identified model 1 as representative, based on the following criterion: *lowest energy*.

The following residues are included in the computation of the global validation metrics.

Well-defined (core) protein residues			
Well-defined core	**Residue range (total)**	**Backbone RMSD (Å)**	**Medoid model**
1	A:160-A:224, A:232-A:238 (72)	0.27	12

Ill-defined regions of proteins are excluded from the global statistics.

Ligands and non-protein polymers are included in the analysis.

The models can be grouped into 4 clusters and 2 single-model clusters were found.

Cluster number	Models
1	1, 3, 5, 6, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 22, 23, 27, 29, 30
2	11, 18, 21, 24, 25, 26
3	2, 4, 7, 10
4	15, 20, 28
Single-model clusters	8; 9

3 Entry composition

There is only 1 type of molecule in this entry. The entry contains 1857 atoms, of which 927 are hydrogens and 0 are deuteriums.

- Molecule 1 is a protein called Forkhead box protein O1.

Mol	Chain	Residues	Atoms						Trace
			Total	C	H	N	O	S	
1	A	119	1857	579	927	175	173	3	0

There are 6 discrepancies between the modelled and reference sequences:

Chain	Residue	Modelled	Actual	Comment	Reference
A	151	GLY	-	expression tag	UNP Q12778
A	152	PRO	-	expression tag	UNP Q12778
A	153	LEU	-	expression tag	UNP Q12778
A	154	GLY	-	expression tag	UNP Q12778
A	155	SER	-	expression tag	UNP Q12778
A	265	GLY	SER	conflict	UNP Q12778

4 Residue-property plots

4.1 Average score per residue in the NMR ensemble

These plots are provided for all protein, RNA and DNA chains in the entry. The first graphic is the same as shown in the summary in section 1 of this report. The second graphic shows the sequence where residues are colour-coded according to the number of geometric quality criteria for which they contain at least one outlier: green = 0, yellow = 1, orange = 2 and red = 3 or more. Stretches of 2 or more consecutive residues without any outliers are shown as green connectors. Residues which are classified as ill-defined in the NMR ensemble, are shown in cyan with an underline colour-coded according to the previous scheme. Residues which were present in the experimental sample, but not modelled in the final structure are shown in grey.

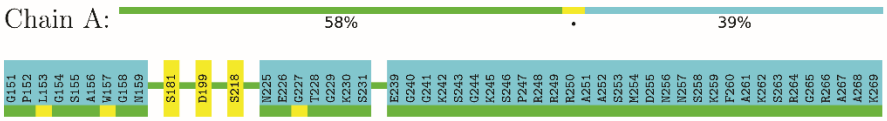
• Molecule 1: Forkhead box protein O1

4.2 Scores per residue for each member of the ensemble

Colouring as in section 4.1 above.

4.2.1 Score per residue for model 1

• Molecule 1: Forkhead box protein O1



4.2.2 Score per residue for model 2

• Molecule 1: Forkhead box protein O1

4.2.3 Score per residue for model 3

• Molecule 1: Forkhead box protein O1

Chain A:

4.2.4 Score per residue for model 4

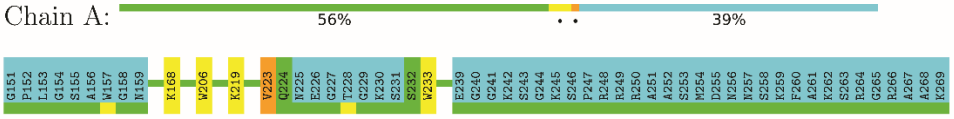
• Molecule 1: Forkhead box protein O1

Chain A:

4.2.5 Score per residue for model 5

• Molecule 1: Forkhead box protein O1

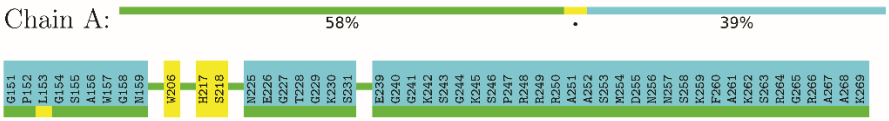
Chain A:



4.2.6 Score per residue for model 6

• Molecule 1: Forkhead box protein O1

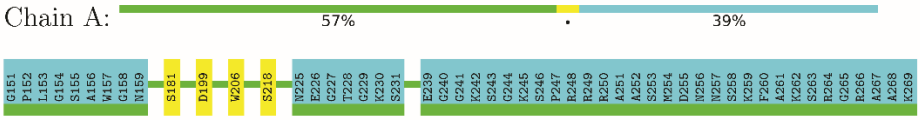
Chain A:



4.2.7 Score per residue for model 7

• Molecule 1: Forkhead box protein O1

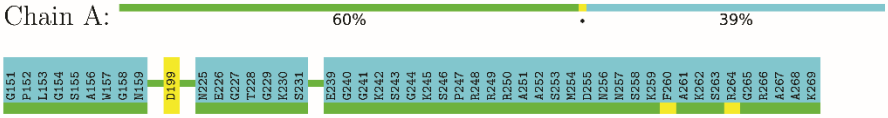
Chain A:



4.2.8 Score per residue for model 8

• Molecule 1: Forkhead box protein O1

Chain A:



4.2.9 Score per residue for model 9

• Molecule 1: Forkhead box protein O1

Chain A:

4.2.10 Score per residue for model 10

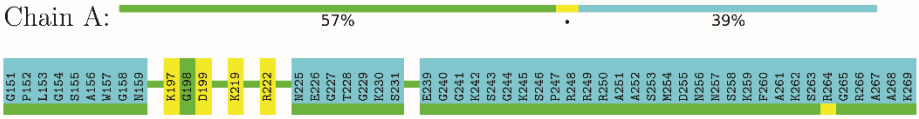
• Molecule 1: Forkhead box protein O1

Chain A:

4.2.11 Score per residue for model 11

• Molecule 1: Forkhead box protein O1

Chain A:



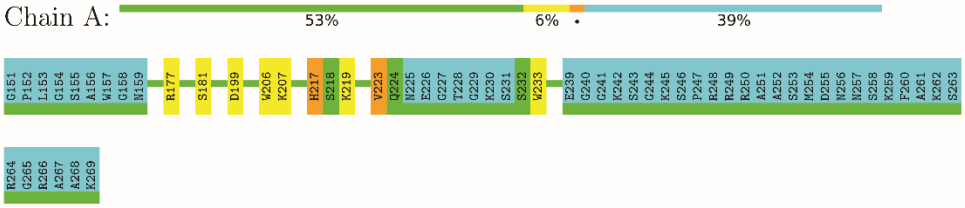
4.2.12 Score per residue for model 12 (medoid)

• Molecule 1: Forkhead box protein O1

Chain A:

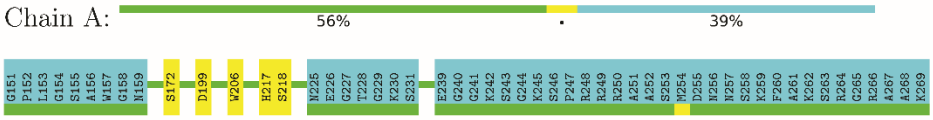
4.2.13 Score per residue for model 13

• Molecule 1: Forkhead box protein O1



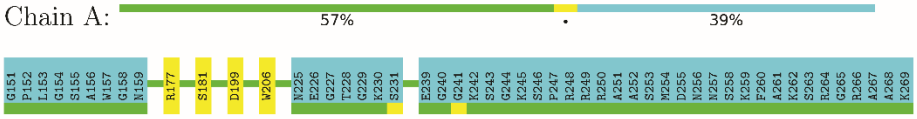
4.2.14 Score per residue for model 14

• Molecule 1: Forkhead box protein O1



4.2.15 Score per residue for model 15

• Molecule 1: Forkhead box protein O1



4.2.16 Score per residue for model 16

• Molecule 1: Forkhead box protein O1

4.2.17 Score per residue for model 17

• Molecule 1: Forkhead box protein O1

4.2.18 Score per residue for model 18

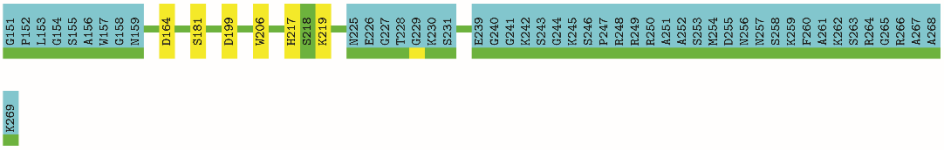
• Molecule 1: Forkhead box protein O1

Chain A:

4.2.19 Score per residue for model 19

• Molecule 1: Forkhead box protein O1

Chain A:



4.2.20 Score per residue for model 20

• Molecule 1: Forkhead box protein O1

Chain A:

4.2.21 Score per residue for model 21

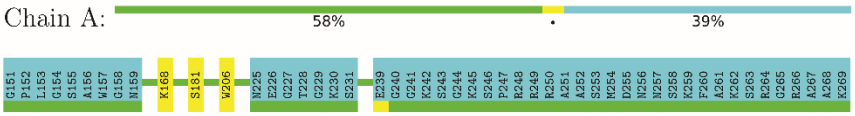
• Molecule 1: Forkhead box protein O1

Chain A:

4.2.22 Score per residue for model 22

• Molecule 1: Forkhead box protein O1

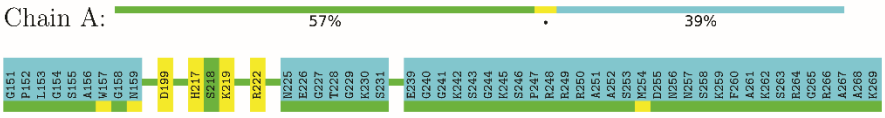
Chain A:



4.2.23 Score per residue for model 23

• Molecule 1: Forkhead box protein O1

Chain A:



4.2.24 Score per residue for model 24

• Molecule 1: Forkhead box protein O1

Chain A:

4.2.25 Score per residue for model 25

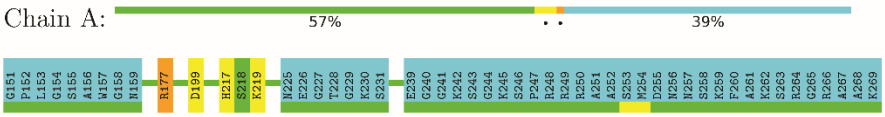
• Molecule 1: Forkhead box protein O1

Chain A:

4.2.26 Score per residue for model 26

• Molecule 1: Forkhead box protein O1

Chain A:



4.2.27 Score per residue for model 27

• Molecule 1: Forkhead box protein O1

Chain A:

4.2.28 Score per residue for model 28

• Molecule 1: Forkhead box protein O1

Chain A:

4.2.29 Score per residue for model 29

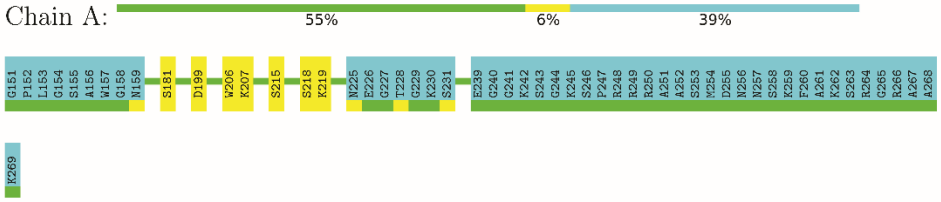
• Molecule 1: Forkhead box protein O1

Chain A:

4.2.30 Score per residue for model 30

• Molecule 1: Forkhead box protein O1

Chain A:



5 Refinement protocol and experimental data overview

The models were refined using the following method: *molecular dynamics*.

Of the 100 calculated structures, 30 were deposited, based on the following criterion: *structures with the least restraint violations*.

The following table shows the software used for structure solution, optimisation and refinement.

Software name	Classification	Version
CYANA	structure calculation	
YASARA	refinement	

The following table shows chemical shift validation statistics as aggregates over all chemical shift files. Detailed validation can be found in section 6 of this report.

Chemical shift file(s)	6qvw_cs.cif
Number of chemical shift lists	1
Total number of shifts	1361
Number of shifts mapped to atoms	902
Number of unparsed shifts	0
Number of shifts with mapping errors	0
Number of shifts with mapping warnings	459
Assignment completeness (well-defined parts)	64%

No validations of the models with respect to experimental NMR restraints is performed at this time.

COVALENT-GEOMETRY INFOmissingINFO

5.1 Too-close contacts

In the following table, the Non-H and H(model) columns list the number of non-hydrogen atoms and hydrogen atoms in each chain respectively. The H(added) column lists the number of hydrogen atoms added and optimized by MolProbity. The Clashes column lists the number of clashes averaged over the ensemble.

Mol	Chain	Non-H	H(model)	H(added)	Clashes
1	A	592	590	590	0±0
All	All	17760	17700	17700	5

The all-atom clashscore is defined as the number of clashes found per 1000 atoms (including hydrogen atoms). The all-atom clashscore for this structure is 0.

All unique clashes are listed below, sorted by their clash magnitude.

Atom-1	Atom-2	Clash(Å)	Distance(Å)	Models	
				Worst	Total
1:A:223:VAL:HG13	1:A:233:TRP:CB	0.44	2.42	4	5

5.2 Torsion angles (i)

5.2.1 Protein backbone (i)

In the following table, the Percentiles column shows the percent Ramachandran outliers of the chain as a percentile score with respect to all PDB entries followed by that with respect to all NMR entries. The Analysed column shows the number of residues for which the backbone conformation was analysed and the total number of residues.

Mol	Chain	Analysed	Favoured	Allowed	Outliers	Percentiles	
1	A	72/119 (61%)	71±1 (98±1%)	1±1 (1±1%)	0±1 (1±1%)	31	76
All	All	2160/3570 (61%)	2118 (98%)	29 (1%)	13 (1%)	31	76

All 2 unique Ramachandran outliers are listed below. They are sorted by the frequency of occurrence in the ensemble.

Mol	Chain	Res	Type	Models (Total)
1	A	217	HIS	12
1	A	232	SER	1

5.2.2 Protein sidechains (i)

In the following table, the Percentiles column shows the percent sidechain outliers of the chain as a percentile score with respect to all PDB entries followed by that with respect to all NMR entries. The Analysed column shows the number of residues for which the sidechain conformation was analysed and the total number of residues.

Mol	Chain	Analysed	Rotameric	Outliers	Percentiles	
1	A	66/98 (67%)	62±1 (95±2%)	4±1 (5±2%)	28	75
All	All	1980/2940 (67%)	1872 (95%)	108 (5%)	28	75

All 18 unique residues with a non-rotameric sidechain are listed below. They are sorted by the frequency of occurrence in the ensemble.

Mol	Chain	Res	Type	Models (Total)
1	A	199	ASP	23
1	A	206	TRP	17
1	A	181	SER	16

Continued on next page...

Continued from previous page...

Mol	Chain	Res	Type	Models (Total)
1	A	219	LYS	12
1	A	218	SER	12
1	A	223	VAL	6
1	A	197	LYS	5
1	A	168	LYS	4
1	A	217	HIS	3
1	A	207	LYS	2
1	A	177	ARG	1
1	A	224	GLN	1
1	A	172	SER	1
1	A	189	LYS	1
1	A	164	ASP	1
1	A	215	SER	1
1	A	237	ASN	1
1	A	195	LYS	1

5.2.3 RNA (i)

There are no RNA molecules in this entry.

5.3 Non-standard residues in protein, DNA, RNA chains (i)

There are no non-standard protein/DNA/RNA residues in this entry.

5.4 Carbohydrates (i)

There are no carbohydrates in this entry.

5.5 Ligand geometry (i)

There are no ligands in this entry.

5.6 Other polymers (i)

There are no such molecules in this entry.

5.7 Polymer linkage issues (i)

There are no chain breaks in this entry.

6 Chemical shift validation

The completeness of assignment taking into account all chemical shift lists is 64% for the well-defined parts and 61% for the entire structure.

6.1 Chemical shift list 1

File name: 6qvw_cs.cif

Chemical shift list name: *starch_output*

6.1.1 Bookkeeping

The following table shows the results of parsing the chemical shift list and reports the number of nuclei with statistically unusual chemical shifts.

Total number of shifts	1361
Number of shifts mapped to atoms	902
Number of unparsed shifts	0
Number of shifts with mapping errors	0
Number of shifts with mapping warnings	459
Number of shift outliers (ShiftChecker)	1

The following assigned chemical shifts were not mapped to the molecules present in the coordinate file.

- No matching atoms found in structure. All 459 occurences are reported below.

Chain	Res	Type	Atom	Shift Data		
				Value	Uncertainty	Ambiguity
A	252	ALA	2HB	1.389	0.0	1
A	217	HIS	2HB	3.217	0.0	1
A	195	LYS	1HB	1.766	0.004	1
A	262	LYS	1HD	1.661	0.0	1
A	248	ARG	1HD	3.185	0.0	1
A	258	SER	2HB	3.917	0.0	1
A	229	GLY	2HA	4.013	0.002	1
A	167	THR	1HG2	1.202	0.002	1
A	180	LEU	1HD1	0.457	0.0	1
A	208	ASN	2HD2	6.93	0.0	1
A	175	GLU	1HB	1.793	0.005	1
A	224	GLN	2HE2	6.752	0.001	1
A	269	LYS	2HB	1.697	0.0	1
A	268	ALA	1HB	1.371	0.0	1

Continued on next page...

Continued from previous page...

Chain	Res	Type	Atom	Shift Data		
				Value	Uncertainty	Ambiguity
A	264	ARG	2HB	1.881	0.0	1
A	225	ASN	2HB	2.605	0.001	1
A	246	SER	1HB	3.828	0.0	1
A	250	ARG	1HG	1.608	0.002	1
A	152	PRO	2HD	3.704	0.0	1
A	152	PRO	2HB	2.26	0.017	1
A	248	ARG	1HB	1.746	0.001	1
A	177	ARG	1HB	1.271	0.003	1
A	184	TYR	2HB	3.377	0.0	1
A	257	ASN	1HB	2.794	0.0	1
A	172	SER	2HB	4.059	0.004	1
A	189	LYS	1HD	1.566	0.001	1
A	206	TRP	1HB	3.283	0.0	1
A	180	LEU	3HD1	0.457	0.0	1
A	197	LYS	1HB	1.621	0.013	1
A	211	ARG	2HD	3.233	0.0	1
A	210	ILE	3HG2	0.682	0.005	1
A	168	LYS	2HD	1.724	0.0	1
A	197	LYS	1HD	1.341	0.0	1
A	170	ILE	1HD1	0.634	0.0	1
A	254	MET	2HG	2.584	0.0	1
A	199	ASP	1HB	2.735	0.001	1
A	255	ASP	2HB	2.694	0.0	1
A	232	SER	2HB	3.465	0.003	1
A	222	ARG	1HD	2.735	0.0	1
A	223	VAL	1HG1	0.904	0.0	1
A	200	SER	1HB	3.896	0.002	1
A	262	LYS	2HG	1.429	0.0	1
A	238	PRO	2HB	2.289	0.005	1
A	218	SER	2HB	3.977	0.006	1
A	216	LEU	3HD2	0.739	0.0	1
A	221	ILE	1HG1	1.439	0.0	1
A	256	ASN	2HD2	6.929	0.0	1
A	177	ARG	2HG	0.744	0.0	1
A	244	GLY	2HA	3.974	0.0	1
A	215	SER	2HB	4.01	0.003	1
A	269	LYS	1HD	1.648	0.008	1
A	235	MET	2HG	2.727	0.001	1
A	248	ARG	2HB	1.817	0.009	1
A	238	PRO	1HG	2.002	0.0	1
A	213	ASN	1HD2	7.59	0.0	1

Continued on next page...

Continued from previous page...

Chain	Res	Type	Atom	Shift Data		
				Value	Uncertainty	Ambiguity
A	180	LEU	1HB	1.523	0.004	1
A	189	LYS	2HD	1.656	0.001	1
A	187	MET	2HG	2.919	0.003	1
A	213	ASN	1HB	2.284	0.0	1
A	214	LEU	3HD1	-0.407	0.0	1
A	197	LYS	2HE	2.875	0.0	1
A	254	MET	1HB	1.984	0.0	1
A	223	VAL	2HG2	0.827	0.001	1
A	165	LEU	1HD2	1.058	0.001	1
A	172	SER	1HB	4.059	0.004	1
A	216	LEU	1HB	1.302	0.0	1
A	247	PRO	1HD	3.703	0.001	1
A	220	PHE	1HB	3.352	0.001	1
A	190	SER	2HB	2.913	0.003	1
A	159	ASN	2HB	2.83	0.002	1
A	223	VAL	3HG1	0.904	0.0	1
A	153	LEU	1HD2	0.787	0.0	1
A	228	THR	1HG2	1.161	0.0	1
A	183	ILE	1HG1	0.455	0.003	1
A	256	ASN	2HB	2.835	0.008	1
A	210	ILE	1HD1	1.072	0.004	1
A	197	LYS	1HG	1.266	0.0	1
A	170	ILE	2HD1	0.634	0.0	1
A	226	GLU	2HB	2.078	0.005	1
A	183	ILE	1HD1	0.46	0.001	1
A	160	LEU	2HB	1.581	0.006	1
A	180	LEU	1HD2	0.803	0.003	1
A	218	SER	1HB	3.925	0.005	1
A	230	LYS	2HB	1.774	0.002	1
A	186	TRP	2HB	3.52	0.001	1
A	269	LYS	2HE	2.979	0.0	1
A	193	TYR	2HB	2.755	0.002	1
A	179	THR	3HG2	0.711	0.0	1
A	189	LYS	1HE	2.898	0.0	1
A	185	GLU	2HG	2.533	0.002	1
A	219	LYS	2HE	2.664	0.007	1
A	242	LYS	2HB	1.857	0.001	1
A	211	ARG	2HG	1.55	0.0	1
A	254	MET	2HB	2.099	0.0	1
A	168	LYS	2HE	2.949	0.0	1
A	231	SER	1HB	3.629	0.0	1

Continued on next page...

Continued from previous page...

Chain	Res	Type	Atom	Shift Data		
				Value	Uncertainty	Ambiguity
A	229	GLY	1HA	3.862	0.0	1
A	204	ALA	1HB	1.32	0.001	1
A	176	LYS	2HE	3.089	0.001	1
A	223	VAL	1HG2	0.827	0.001	1
A	173	SER	2HB	4.209	0.005	1
A	256	ASN	1HB	2.777	0.005	1
A	225	ASN	1HB	2.33	0.003	1
A	179	THR	2HG2	0.711	0.0	1
A	178	LEU	2HD1	1.143	0.001	1
A	244	GLY	1HA	3.974	0.0	1
A	177	ARG	2HB	1.76	0.011	1
A	174	ALA	3HB	1.506	0.001	1
A	213	ASN	2HB	2.739	0.001	1
A	166	ILE	2HG1	1.89	0.0	1
A	177	ARG	2HD	2.21	0.0	1
A	195	LYS	2HB	1.895	0.004	1
A	228	THR	2HG2	1.161	0.0	1
A	269	LYS	2HG	1.373	0.0	1
A	225	ASN	2HD2	6.482	0.005	1
A	152	PRO	1HB	1.879	0.003	1
A	251	ALA	3HB	1.381	0.0	1
A	234	TRP	1HB	2.844	0.0	1
A	157	TRP	1HB	3.069	0.004	1
A	166	ILE	1HG2	0.048	0.001	1
A	196	ASP	1HB	2.677	0.003	1
A	189	LYS	2HB	1.7	0.002	1
A	222	ARG	2HB	1.093	0.0	1
A	240	GLY	2HA	3.922	0.0	1
A	168	LYS	1HD	1.622	0.0	1
A	165	LEU	3HD2	1.058	0.001	1
A	233	TRP	1HB	2.942	0.007	1
A	168	LYS	1HB	1.803	0.006	1
A	187	MET	3HE	1.697	0.0	1
A	253	SER	1HB	3.863	0.0	1
A	160	LEU	1HD1	0.763	0.001	1
A	165	LEU	1HD1	0.882	0.001	1
A	262	LYS	1HG	1.429	0.0	1
A	178	LEU	1HD1	1.143	0.001	1
A	221	ILE	2HG2	0.835	0.005	1
A	237	ASN	2HD2	7.078	0.0	1
A	176	LYS	1HB	1.698	0.006	1

Continued on next page...

Continued from previous page...

Chain	Res	Type	Atom	Shift Data		
				Value	Uncertainty	Ambiguity
A	236	LEU	3HD2	1.076	0.0	1
A	224	GLN	1HG	2.234	0.001	1
A	153	LEU	3HD2	0.787	0.0	1
A	214	LEU	2HD1	-0.407	0.0	1
A	225	ASN	1HD2	7.141	0.001	1
A	238	PRO	2HG	2.002	0.0	1
A	260	PHE	1HB	2.949	0.002	1
A	183	ILE	1HG2	0.737	0.005	1
A	183	ILE	3HD1	0.46	0.001	1
A	171	GLU	2HG	2.414	0.002	1
A	166	ILE	3HD1	0.518	0.001	1
A	160	LEU	3HD1	0.763	0.001	1
A	267	ALA	1HB	1.382	0.0	1
A	187	MET	1HG	2.824	0.001	1
A	208	ASN	2HB	2.847	0.001	1
A	214	LEU	1HD2	-0.503	0.0	1
A	231	SER	2HB	3.685	0.0	1
A	156	ALA	3HB	1.097	0.001	1
A	246	SER	2HB	3.828	0.0	1
A	266	ARG	2HB	1.84	0.0	1
A	265	GLY	1HA	3.933	0.0	1
A	177	ARG	1HD	1.693	0.001	1
A	224	GLN	1HE2	7.473	0.001	1
A	211	ARG	1HD	3.233	0.0	1
A	203	SER	1HB	3.536	0.002	1
A	201	ASN	1HB	2.833	0.004	1
A	191	VAL	1HG1	0.512	0.005	1
A	189	LYS	1HB	1.636	0.005	1
A	191	VAL	2HG2	0.749	0.0	1
A	155	SER	2HB	3.701	0.006	1
A	153	LEU	2HD1	0.826	0.0	1
A	188	VAL	1HG1	1.042	0.006	1
A	205	GLY	1HA	3.89	0.002	1
A	159	ASN	1HB	2.695	0.005	1
A	216	LEU	1HD1	0.704	0.0	1
A	250	ARG	2HB	1.821	0.0	1
A	168	LYS	2HB	1.803	0.006	1
A	200	SER	2HB	3.896	0.002	1
A	208	ASN	1HB	2.776	0.014	1
A	176	LYS	2HD	1.558	0.0	1
A	180	LEU	2HD2	0.803	0.003	1

Continued on next page...

Continued from previous page...

Chain	Res	Type	Atom	Shift Data		
				Value	Uncertainty	Ambiguity
A	256	ASN	1HD2	7.646	0.0	1
A	160	LEU	1HB	1.347	0.005	1
A	222	ARG	1HB	1.093	0.0	1
A	165	LEU	2HD1	0.882	0.001	1
A	190	SER	1HB	2.119	0.008	1
A	259	LYS	2HB	1.613	0.001	1
A	183	ILE	2HG2	0.737	0.005	1
A	181	SER	1HB	4.018	0.004	1
A	176	LYS	1HD	1.843	0.0	1
A	219	LYS	2HB	1.424	0.0	1
A	204	ALA	3HB	1.32	0.001	1
A	178	LEU	2HD2	0.486	0.0	1
A	228	THR	3HG2	1.161	0.0	1
A	210	ILE	2HG2	0.682	0.005	1
A	154	GLY	1HA	3.912	0.004	1
A	237	ASN	1HB	2.961	0.0	1
A	152	PRO	1HG	2.002	0.0	1
A	240	GLY	1HA	3.922	0.0	1
A	269	LYS	2HD	1.648	0.008	1
A	197	LYS	2HG	1.377	0.0	1
A	242	LYS	1HB	1.767	0.003	1
A	202	SER	2HB	3.902	0.0	1
A	226	GLU	1HG	2.244	0.0	1
A	170	ILE	1HG2	0.77	0.001	1
A	167	THR	3HG2	1.202	0.002	1
A	166	ILE	1HG1	0.424	0.001	1
A	182	GLN	1HB	2.166	0.001	1
A	215	SER	1HB	4.01	0.003	1
A	169	ALA	3HB	0.597	0.011	1
A	236	LEU	1HD1	1.035	0.0	1
A	227	GLY	2HA	3.983	0.0	1
A	182	GLN	1HE2	7.585	0.002	1
A	168	LYS	1HG	1.484	0.0	1
A	171	GLU	1HB	1.948	0.002	1
A	176	LYS	1HE	2.99	0.005	1
A	206	TRP	2HB	3.47	0.0	1
A	173	SER	1HB	4.004	0.005	1
A	210	ILE	1HG2	0.682	0.005	1
A	168	LYS	1HE	2.949	0.0	1
A	192	PRO	1HG	1.829	0.003	1
A	157	TRP	2HB	3.131	0.008	1

Continued on next page...

Continued from previous page...

Chain	Res	Type	Atom	Shift Data		
				Value	Uncertainty	Ambiguity
A	207	LYS	1HB	1.194	0.0	1
A	213	ASN	2HD2	6.908	0.0	1
A	163	ALA	3HB	1.336	0.014	1
A	262	LYS	2HB	1.864	0.0	1
A	195	LYS	1HG	1.39	0.002	1
A	170	ILE	2HG2	0.77	0.001	1
A	261	ALA	2HB	1.381	0.0	1
A	248	ARG	1HG	1.62	0.0	1
A	176	LYS	1HG	1.2	0.004	1
A	250	ARG	2HD	3.191	0.0	1
A	167	THR	2HG2	1.202	0.002	1
A	160	LEU	3HD2	0.736	0.008	1
A	191	VAL	3HG2	0.749	0.0	1
A	175	GLU	1HG	2.179	0.0	1
A	154	GLY	2HA	3.912	0.004	1
A	214	LEU	2HD2	-0.503	0.0	1
A	250	ARG	1HB	1.741	0.0	1
A	181	SER	2HB	4.018	0.004	1
A	192	PRO	2HB	2.225	0.001	1
A	259	LYS	1HB	1.613	0.001	1
A	250	ARG	1HD	3.191	0.0	1
A	235	MET	1HG	2.286	0.002	1
A	152	PRO	2HG	2.002	0.0	1
A	178	LEU	3HD2	0.486	0.0	1
A	219	LYS	1HB	0.986	0.0	1
A	192	PRO	2HD	3.664	0.0	1
A	268	ALA	2HB	1.371	0.0	1
A	185	GLU	2HB	2.222	0.001	1
A	180	LEU	3HD2	0.803	0.003	1
A	191	VAL	1HG2	0.749	0.0	1
A	247	PRO	2HD	3.805	0.0	1
A	224	GLN	2HB	1.959	0.0	1
A	169	ALA	1HB	0.597	0.011	1
A	210	ILE	2HD1	1.072	0.004	1
A	171	GLU	2HB	2.072	0.002	1
A	174	ALA	1HB	1.506	0.001	1
A	219	LYS	1HD	1.261	0.0	1
A	252	ALA	3HB	1.389	0.0	1
A	262	LYS	2HE	2.994	0.0	1
A	269	LYS	1HB	1.788	0.0	1
A	222	ARG	1HG	0.327	0.003	1

Continued on next page...

Continued from previous page...

Chain	Res	Type	Atom	Shift Data		
				Value	Uncertainty	Ambiguity
A	178	LEU	1HB	1.444	0.003	1
A	224	GLN	2HG	2.234	0.001	1
A	214	LEU	3HD2	-0.503	0.0	1
A	182	GLN	2HE2	6.821	0.002	1
A	243	SER	1HB	3.873	0.0	1
A	262	LYS	2HD	1.661	0.0	1
A	261	ALA	3HB	1.381	0.0	1
A	247	PRO	2HB	2.279	0.0	1
A	192	PRO	2HG	1.901	0.002	1
A	164	ASP	2HB	2.973	0.005	1
A	162	TYR	1HB	2.738	0.006	1
A	201	ASN	2HD2	6.944	0.005	1
A	269	LYS	1HG	1.373	0.0	1
A	235	MET	2HB	2.286	0.005	1
A	219	LYS	2HG	1.184	0.003	1
A	238	PRO	1HD	3.918	0.003	1
A	248	ARG	2HG	1.62	0.0	1
A	238	PRO	1HB	2.006	0.002	1
A	252	ALA	1HB	1.389	0.0	1
A	233	TRP	2HB	2.881	0.0	1
A	257	ASN	2HB	2.794	0.0	1
A	222	ARG	2HG	0.602	0.0	1
A	255	ASP	1HB	2.632	0.005	1
A	183	ILE	2HD1	0.46	0.001	1
A	171	GLU	1HG	2.184	0.003	1
A	261	ALA	1HB	1.381	0.0	1
A	241	GLY	1HA	3.916	0.011	1
A	184	TYR	1HB	3.298	0.001	1
A	205	GLY	2HA	3.975	0.004	1
A	234	TRP	2HB	2.981	0.0	1
A	245	LYS	2HB	1.823	0.0	1
A	165	LEU	2HB	2.087	0.002	1
A	265	GLY	2HA	3.933	0.0	1
A	220	PHE	2HB	3.352	0.001	1
A	236	LEU	2HD2	1.076	0.0	1
A	221	ILE	3HD1	0.847	0.0	1
A	248	ARG	2HD	3.185	0.0	1
A	236	LEU	1HB	1.462	0.003	1
A	163	ALA	1HB	1.336	0.014	1
A	223	VAL	3HG2	0.827	0.001	1
A	153	LEU	2HB	1.628	0.005	1

Continued on next page...

Continued from previous page...

Chain	Res	Type	Atom	Shift Data		
				Value	Uncertainty	Ambiguity
A	237	ASN	2HB	2.418	0.0	1
A	196	ASP	2HB	2.741	0.022	1
A	208	ASN	1HD2	7.649	0.0	1
A	245	LYS	1HB	1.704	0.0	1
A	189	LYS	2HE	2.978	0.0	1
A	221	ILE	1HD1	0.847	0.0	1
A	170	ILE	3HG2	0.77	0.001	1
A	182	GLN	1HG	2.52	0.002	1
A	170	ILE	2HG1	0.636	0.0	1
A	189	LYS	2HG	1.423	0.004	1
A	249	ARG	2HB	1.809	0.0	1
A	219	LYS	2HD	1.312	0.0	1
A	182	GLN	2HB	2.584	0.002	1
A	187	MET	1HE	1.697	0.0	1
A	230	LYS	2HG	1.363	0.0	1
A	247	PRO	1HB	1.887	0.001	1
A	230	LYS	1HB	1.643	0.0	1
A	160	LEU	2HD2	0.736	0.008	1
A	235	MET	1HB	2.131	0.006	1
A	188	VAL	2HG2	0.941	0.003	1
A	162	TYR	2HB	2.953	0.005	1
A	214	LEU	2HB	1.078	0.0	1
A	216	LEU	2HD2	0.739	0.0	1
A	230	LYS	1HG	1.263	0.0	1
A	161	SER	2HB	4.215	0.006	1
A	178	LEU	3HD1	1.143	0.001	1
A	166	ILE	3HG2	0.048	0.001	1
A	216	LEU	2HD1	0.704	0.0	1
A	159	ASN	2HD2	6.843	0.001	1
A	251	ALA	2HB	1.381	0.0	1
A	177	ARG	1HG	1.187	0.0	1
A	211	ARG	2HB	1.912	0.005	1
A	194	PHE	1HB	2.361	0.006	1
A	236	LEU	2HB	1.73	0.003	1
A	165	LEU	1HB	1.54	0.003	1
A	243	SER	2HB	3.873	0.0	1
A	204	ALA	2HB	1.32	0.001	1
A	176	LYS	2HB	2.133	0.005	1
A	186	TRP	1HB	3.312	0.001	1
A	158	GLY	2HA	3.81	0.001	1
A	216	LEU	2HB	1.531	0.003	1

Continued on next page...

Continued from previous page...

Chain	Res	Type	Atom	Shift Data		
				Value	Uncertainty	Ambiguity
A	175	GLU	2HG	2.179	0.0	1
A	197	LYS	2HB	2.106	0.003	1
A	166	ILE	2HG2	0.048	0.001	1
A	194	PHE	2HB	2.454	0.003	1
A	235	MET	2HE	2.077	0.0	1
A	222	ARG	2HD	2.822	0.0	1
A	179	THR	1HG2	0.711	0.0	1
A	260	PHE	2HB	3.207	0.0	1
A	203	SER	2HB	3.896	0.003	1
A	187	MET	2HE	1.697	0.0	1
A	267	ALA	3HB	1.382	0.0	1
A	170	ILE	3HD1	0.634	0.0	1
A	254	MET	1HG	2.508	0.004	1
A	183	ILE	3HG2	0.737	0.005	1
A	214	LEU	1HB	1.078	0.0	1
A	165	LEU	3HD1	0.882	0.001	1
A	239	GLU	2HG	2.271	0.0	1
A	161	SER	1HB	4.003	0.005	1
A	232	SER	1HB	3.418	0.003	1
A	264	ARG	1HB	1.759	0.0	1
A	198	GLY	1HA	3.94	0.004	1
A	160	LEU	1HD2	0.736	0.008	1
A	219	LYS	1HG	1.184	0.003	1
A	250	ARG	2HG	1.608	0.002	1
A	262	LYS	1HB	1.756	0.0	1
A	178	LEU	1HD2	0.486	0.0	1
A	166	ILE	1HD1	0.518	0.001	1
A	155	SER	1HB	3.637	0.001	1
A	221	ILE	2HD1	0.847	0.0	1
A	221	ILE	2HG1	0.953	0.0	1
A	188	VAL	3HG1	1.042	0.006	1
A	236	LEU	3HD1	1.035	0.0	1
A	183	ILE	2HG1	1.933	0.0	1
A	236	LEU	2HD1	1.035	0.0	1
A	174	ALA	2HB	1.506	0.001	1
A	153	LEU	3HD1	0.826	0.0	1
A	185	GLU	1HG	2.33	0.0	1
A	266	ARG	1HB	1.732	0.0	1
A	239	GLU	1HG	2.184	0.0	1
A	238	PRO	2HD	4.037	0.002	1
A	237	ASN	1HD2	7.64	0.0	1

Continued on next page...

Continued from previous page...

Chain	Res	Type	Atom	Shift Data		
				Value	Uncertainty	Ambiguity
A	258	SER	1HB	3.854	0.0	1
A	212	HIS	2HB	3.174	0.004	1
A	235	MET	3HE	2.077	0.0	1
A	182	GLN	2HG	2.52	0.002	1
A	263	SER	1HB	3.873	0.0	1
A	187	MET	1HB	1.286	0.0	1
A	221	ILE	3HG2	0.835	0.005	1
A	160	LEU	2HD1	0.763	0.001	1
A	188	VAL	2HG1	1.042	0.006	1
A	166	ILE	2HD1	0.518	0.001	1
A	235	MET	1HE	2.077	0.0	1
A	211	ARG	1HG	1.55	0.0	1
A	178	LEU	2HB	1.872	0.007	1
A	210	ILE	3HD1	1.072	0.004	1
A	163	ALA	2HB	1.336	0.014	1
A	189	LYS	1HG	1.344	0.018	1
A	191	VAL	2HG1	0.512	0.005	1
A	156	ALA	2HB	1.097	0.001	1
A	188	VAL	1HG2	0.941	0.003	1
A	224	GLN	1HB	1.882	0.0	1
A	153	LEU	1HB	1.528	0.004	1
A	153	LEU	2HD2	0.787	0.0	1
A	216	LEU	1HD2	0.739	0.0	1
A	168	LYS	2HG	1.538	0.0	1
A	197	LYS	1HE	2.754	0.002	1
A	268	ALA	3HB	1.371	0.0	1
A	198	GLY	2HA	4.137	0.001	1
A	239	GLU	2HB	2.069	0.0	1
A	201	ASN	1HD2	7.691	0.001	1
A	176	LYS	2HG	1.437	0.0	1
A	249	ARG	1HB	1.749	0.0	1
A	227	GLY	1HA	3.983	0.0	1
A	180	LEU	2HD1	0.457	0.0	1
A	165	LEU	2HD2	1.058	0.001	1
A	164	ASP	1HB	2.683	0.004	1
A	236	LEU	1HD2	1.076	0.0	1
A	175	GLU	2HB	2.045	0.005	1
A	216	LEU	3HD1	0.704	0.0	1
A	251	ALA	1HB	1.381	0.0	1
A	221	ILE	1HG2	0.835	0.005	1
A	191	VAL	3HG1	0.512	0.005	1

Continued on next page...

Continued from previous page...

Chain	Res	Type	Atom	Shift Data		
				Value	Uncertainty	Ambiguity
A	214	LEU	1HD1	-0.407	0.0	1
A	219	LYS	1HE	2.712	0.0	1
A	269	LYS	1HE	2.979	0.0	1
A	152	PRO	1HD	3.81	0.002	1
A	192	PRO	1HB	1.809	0.002	1
A	195	LYS	2HG	1.39	0.002	1
A	212	HIS	1HB	3.174	0.004	1
A	207	LYS	2HB	1.194	0.0	1
A	226	GLU	1HB	1.935	0.002	1
A	170	ILE	1HG1	1.727	0.0	1
A	201	ASN	2HB	2.833	0.004	1
A	187	MET	2HB	2.342	0.0	1
A	223	VAL	2HG1	0.904	0.0	1
A	197	LYS	2HD	1.618	0.0	1
A	217	HIS	1HB	3.297	0.0	1
A	199	ASP	2HB	2.814	0.003	1
A	158	GLY	1HA	3.71	0.005	1
A	262	LYS	1HE	2.994	0.0	1
A	156	ALA	1HB	1.097	0.001	1
A	211	ARG	1HB	1.912	0.005	1
A	193	TYR	1HB	2.146	0.004	1
A	253	SER	2HB	3.863	0.0	1
A	159	ASN	1HD2	7.515	0.003	1
A	188	VAL	3HG2	0.941	0.003	1
A	202	SER	1HB	3.902	0.0	1
A	185	GLU	1HB	2.127	0.006	1
A	169	ALA	2HB	0.597	0.011	1
A	153	LEU	1HD1	0.826	0.0	1
A	239	GLU	1HB	1.882	0.003	1
A	241	GLY	2HA	3.986	0.001	1
A	192	PRO	1HD	3.407	0.008	1
A	226	GLU	2HG	2.275	0.0	1
A	180	LEU	2HB	1.737	0.002	1
A	263	SER	2HB	3.873	0.0	1
A	267	ALA	2HB	1.382	0.0	1

6.1.2 Chemical shift referencing

The following table shows the suggested chemical shift referencing corrections.

Nucleus	# values	Correction ± precision, *ppm*	Suggested action
$^{13}C_{\alpha}$	117	-0.32 ± 0.12	None needed (< 0.5 ppm)
$^{13}C_{\beta}$	107	0.12 ± 0.18	None needed (< 0.5 ppm)
$^{13}C'$	114	-0.64 ± 0.13	Should be applied
^{15}N	110	0.17 ± 0.14	None needed (< 0.5 ppm)

6.1.3 Completeness of resonance assignments

The following table shows the completeness of the chemical shift assignments for the well-defined regions of the structure. The overall completeness is 64%, i.e. 593 atoms were assigned a chemical shift out of a possible 931. 10 out of 10 assigned methyl groups (LEU and VAL) were assigned stereospecifically.

	Total	^{1}H	^{13}C	^{15}N
Backbone	339/356 (95%)	134/142 (94%)	139/144 (97%)	66/70 (94%)
Sidechain	173/471 (37%)	18/280 (6%)	149/169 (88%)	6/22 (27%)
Aromatic	81/104 (78%)	47/54 (87%)	31/44 (70%)	3/6 (50%)
Overall	593/931 (64%)	199/476 (42%)	319/357 (89%)	75/98 (77%)

The following table shows the completeness of the chemical shift assignments for the full structure. The overall completeness is 61%, i.e. 895 atoms were assigned a chemical shift out of a possible 1475. 11 out of 11 assigned methyl groups (LEU and VAL) were assigned stereospecifically.

	Total	^{1}H	^{13}C	^{15}N
Backbone	556/587 (95%)	215/234 (92%)	231/238 (97%)	110/115 (96%)
Sidechain	243/763 (32%)	20/457 (4%)	214/259 (83%)	9/47 (19%)
Aromatic	96/125 (77%)	55/65 (85%)	37/53 (70%)	4/7 (57%)
Overall	895/1475 (61%)	290/756 (38%)	482/550 (88%)	123/169 (73%)

6.1.4 Statistically unusual chemical shifts

The following table lists the statistically unusual chemical shifts. These are statistical measures, and large deviations from the mean do not necessarily imply incorrect assignments. Molecules containing paramagnetic centres or hemes are expected to give rise to anomalous chemical shifts.

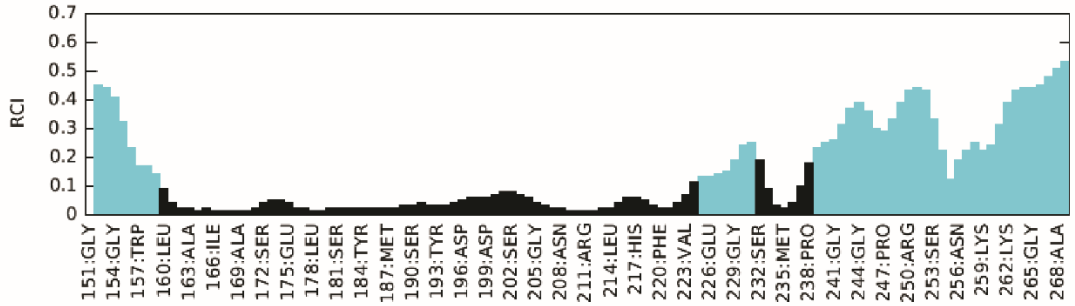
Mol	Chain	Res	Type	Atom	Shift, *ppm*	Expected range, *ppm*	Z-score
1	A	169	ALA	HA	1.85	6.46 – 2.06	-5.5

6.1.5 Random Coil Index (RCI) plots

The image below reports *random coil index* values for the protein chains in the structure. The height of each bar gives a probability of a given residue to be disordered, as predicted from the available chemical shifts and the amino acid sequence. A value above 0.2 is an indication

of significant predicted disorder. The colour of the bar shows whether the residue is in the well-defined core (black) or in the ill-defined residue ranges (cyan), as described in section 2 on ensemble composition.

Random coil index (RCI) for chain A:



10.7 Publikace "Forkhead Domains of FOXO Transcription Factors Differ in both Overall Conformation and Dynamics" [54]

Psenakova K.; **Kohoutova K.**; Obsilova V.; Ausserlechner M. J.; Veverka V.; Obsil T.: Forkhead Domains of FOXO Transcription Factors Differ in both Overall Conformation and Dynamics, *Cells*, **8**(9), 966, 2019

cells

MDPI

Article

Forkhead Domains of FOXO Transcription Factors Differ in both Overall Conformation and Dynamics

Katarina Psenakova [1,2,†], Klara Kohoutova [1,†], Veronika Obsilova [2], Michael J. Ausserlechner [3], Vaclav Veverka [4,5,*] and Tomas Obsil [1,2,*]

1 Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University, 128 43 Prague, Czech Republic
2 Department of Structural Biology of Signaling Proteins, Division BIOCEV, Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences, 252 50 Vestec, Czech Republic
3 Department of Pediatrics I, Medical University Innsbruck, A-6020 Innsbruck, Austria
4 Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, 166 10 Prague, Czech Republic
5 Department of Cell Biology, Faculty of Science, Charles University, 128 43 Prague, Czech Republic
* Correspondence: vaclav.veverka@uochb.cas.cz (V.V.); obsil@natur.cuni.cz (T.O.); Tel.: +420-220183135 (V.V.); +420-221951303 (T.O.)
† These authors contributed equally to this work.

Received: 30 July 2019; Accepted: 23 August 2019; Published: 24 August 2019

Abstract: FOXO transcription factors regulate cellular homeostasis, longevity and response to stress. FOXO1 (also known as FKHR) is a key regulator of hepatic glucose production and lipid metabolism, and its specific inhibition may have beneficial effects on diabetic hyperglycemia by reducing hepatic glucose production. Moreover, all FOXO proteins are considered potential drug targets for drug resistance prevention in cancer therapy. However, the development of specific FOXO inhibitors requires a detailed understanding of structural differences between individual FOXO DNA-binding domains. The high-resolution structure of the DNA-binding domain of FOXO1 reported in this study and its comparison with structures of other FOXO proteins revealed differences in both their conformation and flexibility. These differences are encoded by variations in protein sequences and account for the distinct functions of FOXO proteins. In particular, the positions of the helices H1, H2 and H3, whose interface form the hydrophobic core of the Forkhead domain, and the interactions between hydrophobic residues located on the interface between the N-terminal segment, the H2-H3 loop, and the recognition helix H3 differ among apo FOXO1, FOXO3 and FOXO4 proteins. Therefore, the availability of apo structures of DNA-binding domains of all three major FOXO proteins will support the development of FOXO-type-specific inhibitors.

Keywords: FOXO1; Forkhead domain; structure; DNA-binding domain; nuclear magnetic resonance

1. Introduction

The members of the Forkhead box (FOX) family of transcription factors share a conserved winged-helix DNA-binding domain (DBD) known as the Forkhead domain [1,2]. This domain consists of approximately 110 amino acids and folds into three major α-helices (H1-H3), a short twisted three-stranded antiparallel β-sheet (comprising three β strands S1–S3) and two wing-like loops (W1 and W2), and their arrangement within the Forkhead domain is H1-S1-H2-H3-S2-W1-S3-W2 [3]. The third helix H3 is the main DNA recognition element that binds to the major groove roughly perpendicularly to the DNA axis and makes most of the base-specific contacts with the core sequence [3–8]. Furthermore, the DNA-binding surface also includes the loop region W1, the loop between helices H4 and H3 and the N-terminal segment preceding the helix H1. In comparison with other FOX subclasses, the

Forkhead domains of FOXO proteins contain a 5-amino-acid insertion between α-helices H2 and H3 (residues KGDSN). All FOXO-DBDs recognize consensus sequences 5′-GTAAACAAtab-3′ and 5′-(C/A)(A/C)AAA(C/T)AA-3′ known as the DAF-16 family member-binding element (DBE) and the insulin responsive element (IRE), respectively, which include the core sequence 5′-(A/C)AA(C/T)A-3′ recognized by all Forkhead transcription factors [9–12]. However, the factors that contribute to DNA binding specificity to diverse DNA sequences adjacent to the core sequence among individual FOX members are still not fully understood [13,14]. All FOXO proteins bind to DNA duplexes as monomers similarly to other Forkhead proteins [3–8].

The "O" subclass of FOX family consists of four proteins (FOXO1/FKHR, FOXO3/FKHRL1, FOXO4/AFX and FOXO6), which regulate cellular homeostasis, longevity and response to stress by modulating diverse cellular functions, including cell cycle, stress resistance, DNA damage repair, apoptosis, tumor resistance and metabolism (reviewed in [15–17]). The transcriptional activity of FOXO proteins is negatively regulated by protein kinase B (PKB, also known as Akt), which phosphorylates three Ser/Thr residues and induces binding to the scaffolding protein 14-3-3. In turn, 14-3-3 protein binding sterically obscures both the nuclear localization sequence and the Forkhead domain of FOXO proteins, thereby shifting the equilibrium of FOXO localization toward the cytoplasm [18–22]. In addition to the Forkhead domain, FOXO proteins contain two other conserved regions (CR1 and CR3) located within long and presumably disordered segments bordering the Forkhead domain (Figure 1). CR1 is positioned at the N-terminus and contains the first PKB phosphorylation site, which is also a 14-3-3 protein-binding motif, whereas CR3 is located at the C-terminus and represents the transactivation domain [23]. The nuclear localization sequence partly overlaps with the C-terminal part of the Forkhead domain and contains the second PKB phosphorylation site/14-3-3-binding motif. The third PKB phosphorylation site, which is not the 14-3-3 binding motif, is located approximately 60 residues downstream of the second site.

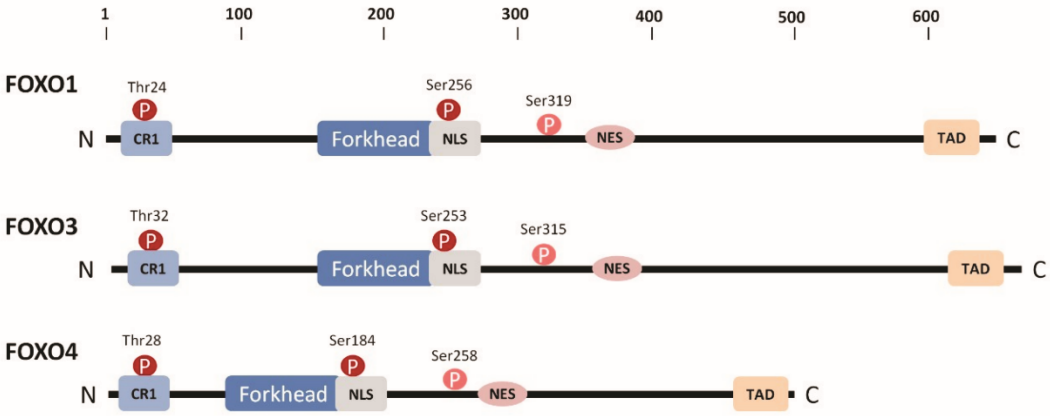


Figure 1. Domain structure of FOXO proteins. The positions of PKB/Akt phosphorylation sites are indicated by circles. The first two PKB/Akt phosphorylation sites are also binding motifs for the scaffolding 14-3-3 protein. CR1, conserved region 1; NLS, nuclear localization signal; NES, nuclear export signal; TAD (CR3), transactivation domain.

FOXO proteins are further regulated through a number of additional posttranslational modifications, including phosphorylation, acetylation, ubiquitination, and methylation (reviewed in [24–26]). Sites of these modifications are localized within both the Forkhead domain and long flexible regions bordering the Forkhead domain, and their modifications affect the stability of FOXO proteins, binding to the target DNA, and interactions with other binding partners [18,19,27–30].

FOXO proteins were initially considered potent tumor suppressors due to their ability to induce cell cycle arrest and apoptosis; however, recent studies have shown that FOXO proteins can also promote tumor development and progression by maintaining cellular homeostasis and by

inducing drug-resistance [31–33]. Moreover, the resistance to cytotoxic chemotherapeutics is linked to deregulated signaling not only through FOXO proteins but also FOXM1, which is a potent oncogene whose expression and activity are negatively regulated by FOXO3 [34,35]. FOXO3 and FOXM1 exert opposing functions in the regulation of cancer-related processes, and targeting the FOXO3-FOXM1 axis could be a viable strategy for the treatment of cancer. Therefore, blocking FOX transcriptional activities with specific inhibitors may help to prevent drug resistance in cancer therapy. Previous studies have shown that selective pharmacological inhibition of FOXO1 may have beneficial effects on diabetic hyperglycemia by reducing hepatic glucose production [36,37]. Several small-molecule compounds reported by Langlet et al. [37] were shown to specifically clear FOXO1 from glucose-6-phosphatase promoter. However, design and/or further optimization of specific FOXO inhibitors requires a detailed understanding of structural differences between individual FOXO-DBDs. Structures of both apo and DNA-bound forms of FOXO3-DBD and FOXO4-DBD and of the FOXO1-DBD:DNA complex have already been reported. In this study, we report a high-resolution solution structure of apo FOXO1-DBD, which allowed us to systematically compare all three major FOXO-DBDs in both their apo and DNA-bound forms. This comparison revealed that apo FOXO-DBDs differ in mutual positions of the helices H1, H2 and H3, that form the Forkhead domain core and in interactions between hydrophobic regions within the N-terminal segment, the H2-H3 loop, and the recognition helix H3. Moreover, FOXO proteins also show variations in conformational heterogeneity in the H4-H3 loop and in the N-terminal part of the helix H3.

2. Materials and Methods

2.1. FOXO1-DBD Expression and Purification

DNA encoding mouse FOXO1-DBD (residues 156−269) was ligated into the pGEX-6P-1 vector (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, USA) using the BamHI and XhoI sites. $^{13}C/^{15}N$- and ^{15}N-labeled FOXO1-DBD was expressed as an N-terminal GST-tagged fusion protein in *Escherichia coli* BL21(DE3) cells grown in minimal medium containing ^{15}N-ammonium sulfate and/or ^{13}C-glucose as the sole nitrogen and carbon source. Protein expression was induced by 0.5 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside for 18 h at 20 °C. Pelleted cells were resuspended in buffer 2× PBS, 10 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM EDTA, and lysed by sonication at 4 °C. The protein was purified using Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, USA) in buffer containing 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% (*w/v*) glycerol at pH 7.5. The fusion protein was eluted at room temperature using 10 mM glutathione and dialyzed against buffer containing 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% (*w/v*) glycerol at pH 8.0. The affinity tag was removed by PreScission Protease cleavage overnight at 4 °C (10 U/mg recombinant fusion protein). After cleavage, FOXO1-DBD was purified by size-exclusion chromatography (HiLoad Superdex 75; GE Healthcare) in 20 mM phosphate buffer containing 50 mM KCl, 1 mM TCEP, 1 mM EDTA and 10% (*w/v*) glycerol at pH 6.5.

2.2. NMR Spectroscopy

NMR spectra were acquired at 25 °C on Bruker Avance III™ HD 600 MHz and 850 MHz spectrometers, both equipped with a $^{1}H/^{13}C/^{15}N$ cryoprobe. The 350-µL sample of 380 µM $^{13}C/^{15}N$-labeled FOXO1-DBD in buffer containing 20 mM sodium phosphate at pH 6.5, 50 mM KCl, 1 mM TCEP, 1 mM EDTA and 10% D_2O/90% H_2O was used for the sequence-specific backbone resonance assignment. The protein spectra were affected by C-terminal degradation, which was manifested as peak doubling and signal intensity reduction over time. Protein fitness was assessed by regular acquisition of 2D ^{1}H-^{15}N HSQC spectra. In total, protein samples from three independent purifications were used for NMR data collection. The spectra were processed using Bruker Topspin 3.5 and were analyzed in NMRFAM-SPARKY [38]. Sequence-specific backbone and side-chain resonance assignment was obtained using a series of standard triple-resonance spectra (HNCO, HN(CA)CO, HNCACB, CBCA(CO)NH, HBHA(CO)NH, CCC(CO)HN

and HCCH-TOCSY, experiments) [39,40]. In particular, 104 of the 114 (91%) backbone amide signals in the 2D ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of FOXO1-DBD were assigned (Supplementary Figure S1). A set of ^{1}H-^{1}H distance constraints required for structural determination was obtained from intensities of NOE cross peaks in the 3D ^{15}N/^{1}H NOESY-HSQC and ^{13}C/^{1}H NOESY-HMQC spectra, both acquired with τm = 120 ms. This yielded unique assignments for 95.8% (3006/3139) of the NOE peaks, providing 1712 non-redundant ^{1}H-^{1}H distance constraints.

2.3. NMR Structure Calculation

FOXO1-DBD structural calculation was performed in Cyana 3.98 using the combined automated NOE assignment and structure determination protocol (Candid) [41] followed by five cycles of simulated annealing combined with redundant dihedral angle constraints (Redac) [42]. The NOESY data were complemented by the backbone torsion angle constraints obtained from the NMR resonance assignments using TALOS+ [43] as an input. The resulting set of FOXO1-DBD converged structures with no NOE-derived distance constraints and van der Waals violations greater than 0.5 Å or dihedral angle constraint violation greater than 5° were refined in explicit water using YASARA [44]. The 30 FOXO1-DBD structures with the lowest total energy were selected, analyzed and validated using the Protein Structure Validation Software suite (http://psvs-1_5-dev.nesg.org). The constraints and structural quality statistics for the final water-refined set of FOXO1-DBD structures are summarized in Table 1. The structures, NMR resonance assignments and constraints used in structural calculation were deposited in the Protein Data Bank (PDB code: 6QVW) and Biological Magnetic Resonance Bank (BMRB code: 34364).

Table 1. Statistics for the final water-refined sets of structures.

Non-Redundant Distance and Angle Constrains	
Total number of NOE constraints	1712
Short-range NOEs	
Intra-residue (i = j)	445
Sequential (|i − j| = 1)	402
Medium-range NOEs (1 < | i − j | < 5)	325
Long-range NOEs (|i − j| ≥ 5)	530
Torsion angles	128
Hydrogen bond restrains	-
Total number of restricting constraints	1840
Total restricting constraints per restrained residue	16.3
Residual constraint violations	
Distance violations per structure	
0.1–0.2 Å	7.44
0.2–0.5 Å	2.46
> 0.5 Å	0
Root mean square (r.m.s.) of distance violation per constraint	0.02 Å
Maximum distance violation	0.48 Å
Dihedral angle viol. per structure	
1–10°	3.12
> 10°	0
r.m.s. of dihedral violations per constraint	0.55°
Maximum dihedral angle viol.	5.0°
Ramachandran plot summary	
Most favored regions	98.3%
Additionally allowed regions	1.7%
Generously allowed regions	0.0%
Disallowed regions	0.0%
r.m.s.d. to the mean structure	all/ordered [1]
All backbone atoms	10.0/0.4 Å
All heavy atoms	10.1/0.8 Å

Table 1. *Cont.*

Non-Redundant Distance and Angle Constrains	
PDB entry	6QVW
BMRB accession code	34364

[1] Residues with sum of phi and psi order parameters > 1.8.

3. Results and Discussion

3.1. Solution Structure of the DNA-binding Domain of FOXO1

For detailed understanding of structural differences between individual FOXO DNA-binding domains, we determined the solution structure of the apo FOXO1-DBD. FOXO1-DBD adopts the expected Forkhead winged-helix fold (Figure 2A,B), and similar to FOXO3-DBD and FOXO4-DBD structures, the region between helices H2 and H3 of FOXO1-DBD contains an additional short helix, H4, which partly overlaps with the N-terminal end of the 5-amino-acid insertion [45,46]. A well-defined structure with an average root mean square deviation (R.M.S.D.) for C_α atoms less than 1.0 Å was obtained for residues of the α-helices H1, H2 and H4, β-strand S1, C-terminal half of α-helix H3, and β-strands S2 and S3 (Figure 2B). Conversely, higher conformational heterogeneity, which reflects smaller numbers of experimentally derived restrains, presumably due to increased dynamics, was observed in the N-terminal segment, N-terminal half of the α-helix H3, loop between H3 and S2 and both loops W1 and W2, which is in the regions involved in DNA binding [6–8].

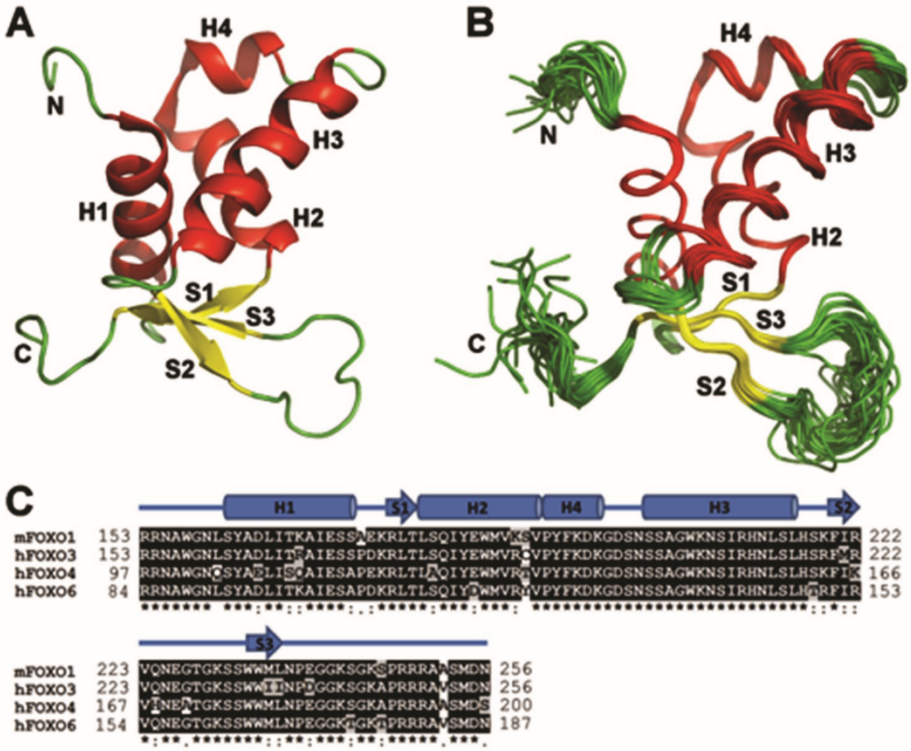


Figure 2. Solution structure of FOXO1-DBD. (**A**) Cartoon representation of the NMR solution structure of FOXO1-DBD showing residues 156-243. Secondary structure elements are labeled according to the nomenclature typical of the winged-helix motif [3]. (**B**) 30 superimposed FOXO1-DBD conformers of the NMR solution structure ensemble. (**C**) Sequence alignment of FOXO forkhead domains. Secondary-structure elements (based on the FOXO1-DBD) are indicated at the top. Protein sequences of mouse and human FOXO1-DBD are identical.

3.2. Comparison of FOXO1-DBD with Forkhead Domains of Other FOXO Proteins

Because the previously reported solution structures of apo FOXO3-DBD (PDB ID: 2K86 [46]) and apo FOXO4-DBD (PDB ID: 1E17 [45]) were solved with constructs of different lengths, apo FOXO-DBDs were structurally compared using residues 156-239 (mouse FOXO1 numbering) present in all three structures. The superimposition of representative conformers (representatives of the most populated clusters assessed by cluster analysis of conformational ensembles of NMR solution structures [47]) revealed that the apo FOXO1-DBD can be superimposed with the solution structures of apo FOXO3-DBD and FOXO4-DBD with root-mean-square deviations (R.M.S.D.) of 2.05 and 2.12 Å, respectively, over 84 C_α atoms (Supplementary Table S1). FOXO3-DBD and FOXO4-DBD can be superimposed with the R.M.S.D. of 2.50 Å over 84 C_α atoms. The most significant differences are observed in the loop between helices H2 and H3, which contains the additional helix H4, and the N-terminal half of helix H3, whose orientation differs among all three FOXO-DBDs (Figure 3 and Figure S2). Structural superimposition and difference residue-residue distance maps calculated for selected conformers also suggest that the mutual positions of the α-helices H1, H2 and H3, whose interface form the hydrophobic core of the domain, apparently differ among apo-FOXO-DBDs. To describe these differences, three isoleucine residues located approximately in the middle of all three helices in regions with high backbone coordinate precision were selected (I166, I183 and I210 in the case of FOXO1), and the distances of their C_α atoms were compared (Figure S3). The results suggested that FOXO1-DBD is more compact (has shorter H2-H3 and H1-H2 distances) than the other two FOXO proteins, whereas FOXO4-DBD appears to be less compact, based on the sum of C_α-C_α distances between selected Ile residues. The differences in FOXO-DBDs core packing were further corroborated by calculating the contact area of residues from helices H1, H2 and H3 using the program AREAIMOL [48]. These calculations revealed the contact area of 893 $Å^2$, 900 $Å^2$ and 929 $Å^2$ for FOXO1-, FOXO3- and FOXO4-DBD, respectively. In addition, all three apo forms also show different interactions between hydrophobic residues located on the interface between the N-terminal segment (Trp157 and Tyr162 in FOXO1), the H2–H3 loop (Tyr193 and Phe194), and the helix H3 (Trp206) (Figure 4). This cluster of hydrophobic residues forms part of the DNA-binding surface that makes contacts with the DNA backbone (Figure 4D). Furthermore, interactions in this region fine-tune the Forkhead domain DNA-binding specificity and affinity, most likely by affecting the position of the recognition helix H3 with respect to the helices H1 and H2, as shown for hepatocyte nuclear factor 3 (HNF-3, also known as FOXA), FOXC1 (FREAC3) and FOXD1 (FREAC4) proteins [13,49]. In the FOXO1-DBD structure, the side-chains of Tyr193, Phe194 and Trp206 interact in a face-to-edge fashion. In contrast, in FOXO3-DBD, the side-chain of Trp206 is rotated towards the side-chain of Tyr162 from the N-terminus of the helix H1 and makes a hydrogen bond with the hydroxyl group of Tyr193 from the helix H4. Interactions in FOXO4-DBD resemble those observed in FOXO1-DBD, but the side-chains of Phe138 and Trp150 interact in a face-to-face manner.

The comparison between the conformational flexibility of NMR solution structure ensembles using the MOBI server [50] revealed that FOXO1-DBD and FOXO3-DBD are comparable in this regard and show high flexibility (R.M.S.D. difference from average for C_α atoms > 1 Å) only within the H3-S2 and S2-S3 loops (Figure 5). Conversely, FOXO4-DBD exhibits a substantially increased conformational heterogeneity also in the H1-S1 loop and, especially, within the H4-H3 loop and N-terminal part of the helix H3.

Thus, the comparison of solution structures of apo FOXO-DBDs reveals differences both in their conformation and local flexibility. These differences presumably reflect variations in FOXO-DBD protein sequences, which are present, for example, within the α-helix H1 and C-termini of the helix H2 and β-strand S3 (Figure 2C and Figure S4). Accordingly, these differences may account for the distinct functions of FOXO proteins. For example, FOXO3- and FOXO4-DBDs have been shown to interact with the DNA-binding domain of transcription factor p53 [46,51]. Because the N-terminal segment of FOXO-DBD including aromatic residues W101 and Y106 (in FOXO4 numbering) is involved in this interaction, it is entirely possible that FOXO variants interact with p53 with different affinities

due to the structural differences within the N-terminal parts of their DBDs. Moreover, the observed structural differences also suggest that FOXO-DBDs, although highly homologous, may differ in their DNA-binding affinities for different sequences.

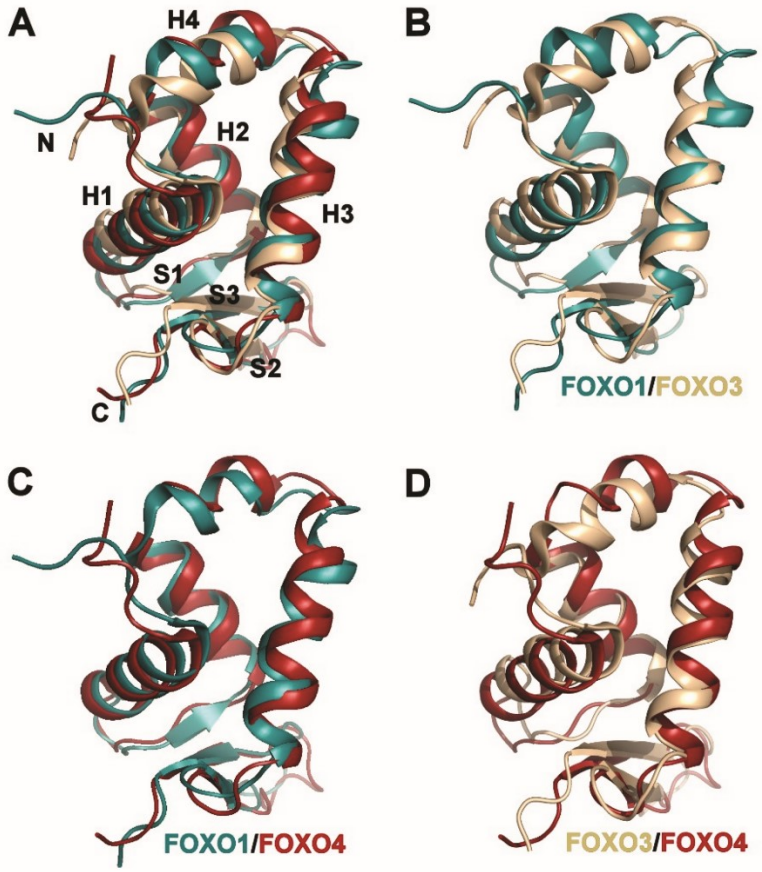


Figure 3. Comparison of FOXO1-DBD with previously reported solution structures of FOXO3-DBD and FOXO4-DBD. (**A**) Superimposition of representative conformers of FOXO1-DBD (conf. no. 16), FOXO3-DBD (conf. no. 11, PDB ID: 2K86 [46]) and FOXO4-DBD (conf. no. 3, PDB ID: 1E17 [45]). Selected conformers are representatives of the most populated clusters obtained by cluster analysis of conformational ensembles of NMR solution structures [47]. Structural comparison was performed using residues 156–239 (mouse FOXO1 numbering). Structures were superimposed using all C_α atoms. (**B**–**D**) Superimposition of FOXO1/FOXO3, FOXO1/FOXO4 and FOXO3/FOXO4 DBDs.

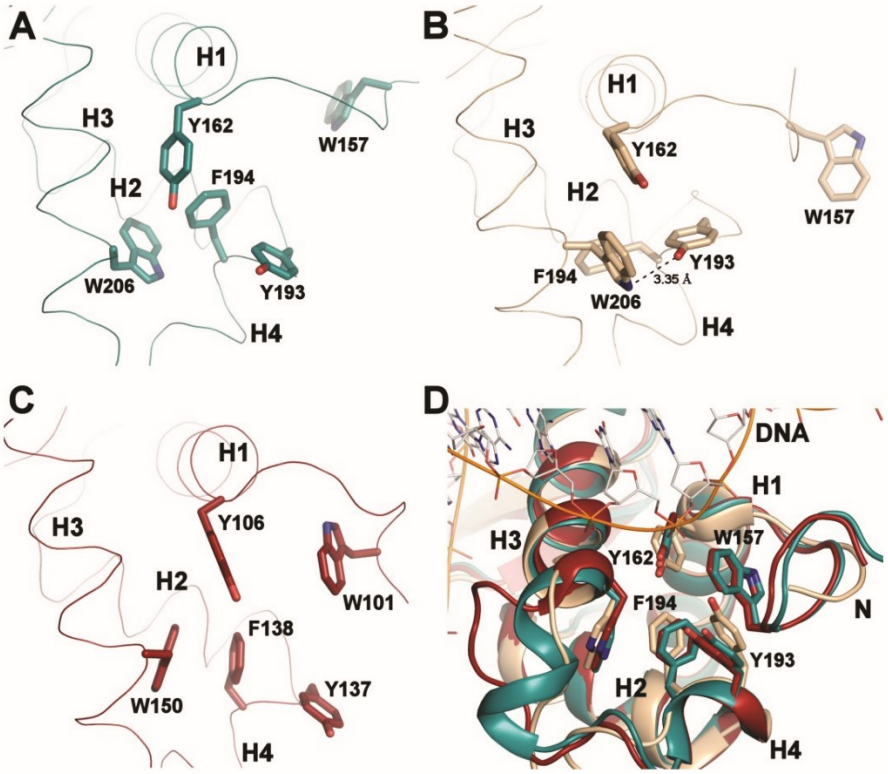


Figure 4. Interactions of hydrophobic residues on the interface between the N-terminal segment, the H2–H3 loop and helix H3. (**A**) Interactions observed in apo FOXO1-DBD (conf. no. 16). (**B**) Interactions observed in apo FOXO3-DBD (conf. #11, PDB ID: 2K86 [46]). (**C**) Interactions observed in apo FOXO4-DBD (conf. no. 3, PDB ID: 1E17 [45]). (**D**) Interactions observed in DNA-bound forms of FOXO1-DBD (PDB ID: 3COA [7], shown in dark cyan), FOXO3-DBD (PDB ID: 2UZK [6], shown in sand) and FOXO4-DBD (PDB ID: 3L2C [8], shown in dark red). For clarity, only DNA in the FOXO1-DBD:DNA complex is shown.

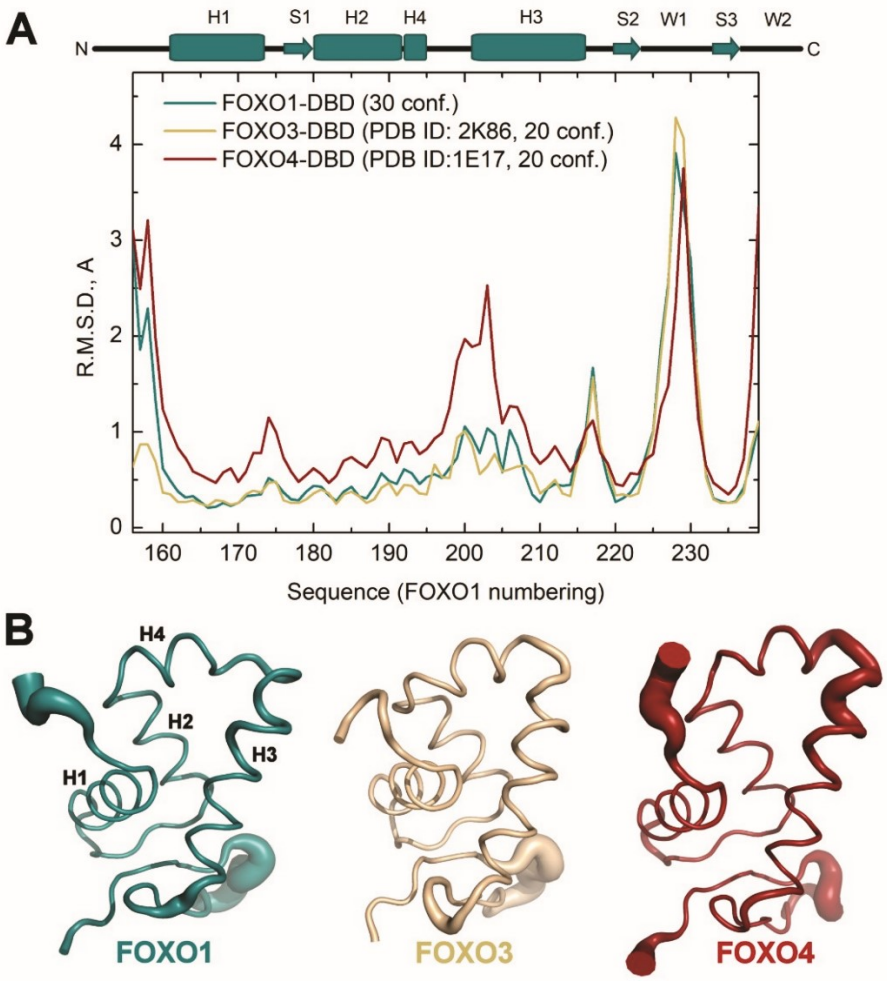


Figure 5. Conformational flexibility of FOXO-DBDs. (**A**) Root Mean Squared Deviation (R.M.S.D.) difference from average as a function of the sequence of FOXO1-DBD, FOXO3-DBD (PDB ID: 2K86 [46]) and FOXO4-DBD (PDB ID: 1E17 [45]). RMSD profiles were calculated using the MOBI server [50]. Secondary-structure elements (based on the FOXO1-DBD) are indicated at the top. (**B**) Sausage representation of NMR ensembles of FOXO1-DBD, FOXO3-DBD and FOXO4-DBD. The backbone diameter indicates the conformational mobility.

3.3. Structural Differences Between Apo and DNA-bound Forms of FOXO1-DBD

The structure of apo FOXO1-DBD can be superimposed with the crystal structure of the FOXO1-DBD:DNA complex (PDB ID: 3COA [7]) with an R.M.S.D. of 2.36 Å over 83 C_α atoms. Substantial differences are observed in the N-terminal segment, N-terminal part of the recognition helix H3, which is in the DNA-bound form shifted by 2 Å towards the N-terminal segment, loop between β-strands S2 and S3 (called wing W1), loop between H3 and S2, and loop between α-helices H2 and H3, that is, mainly in regions involved in DNA binding because the DNA-binding surface is formed by the helix H3, S2-S3 loop (wing W1) and N-terminal segment (Figure 6 and Figure S5) [7]. The positions of the α-helices H1 and H2 and β-strands S1-S3 remain virtually unchanged. Similar DNA-binding-induced conformational changes were observed in FOXO3-DBD and FOXO4-DBD [7,8]. The superimposition of apo and DNA-bound forms of FOXO3-DBD (2.72 Å over 81 C_α atoms) revealed additional changes in the position of the α-helix H1, whose C-terminal end is in the DNA-bound form, in comparison with the apo structure, which is shifted by 1.6 Å towards the β-strand S3 (Figure 6B) [6,46]. In addition, the C-terminus of H2, the H2–H3 loop and the N-terminus of H3 have substantially different conformations in both structures, but this is, at least partly, caused by

crystal contacts because the H2–H3 loop of the FOXO3-DBD:DNA complex interacts with the DNA backbone of the symmetry-related copy of the complex. In FOXO4-DBD, the apo and the DNA-bound forms can be superimposed with an R.M.S.D. of 2.48 Å over 85 C_α atoms, and DNA binding has no effect on the positions of the three major helices H1, H2 and H3 (Figure 6C) [8,45]. Nevertheless, the recognition helix H3 of the FOXO4-DBD:DNA complex is compared to the apo structure shortened at the N-terminus by approximately one turn and thus similarly to the FOXO3-DBD:DNA structure. Although the interactions between hydrophobic residues at the interface of the N-terminal segment, H2-H3 loop, and helix H3 differ among apo FOXO-DBDs (Figure 4), the DNA-bound forms have similar arrangements of these residues (Figure 4D). This suggests that individual FOXO-DBDs undergo different conformational transitions upon their binding to the target DNA. This transition has been previously suggested by detailed analysis of interaction between FOXO4-DBD and DNA, which revealed that FOXO4-DBD binding to DNA involves a profound reduction of segmental dynamics of DBD upon complex formation [52].

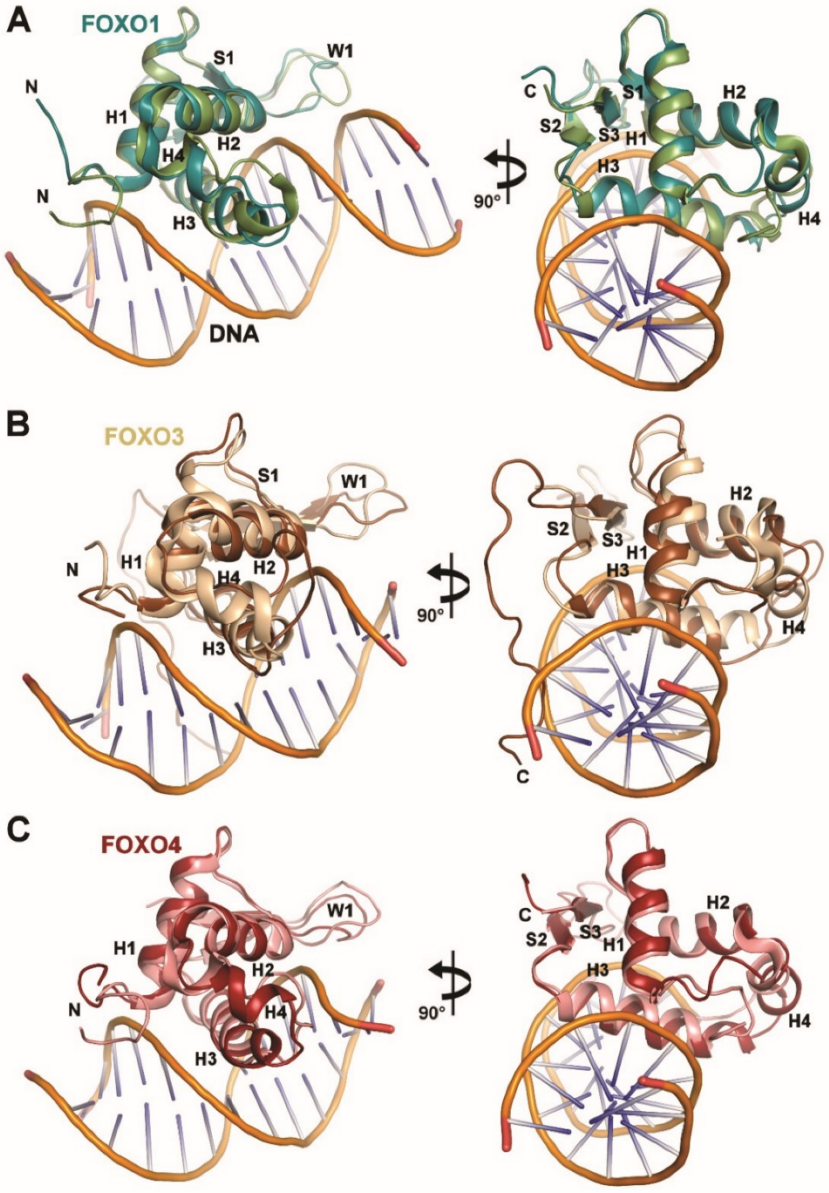


Figure 6. Comparison between apo and DNA-bound forms of FOXO-DBDs. (**A**) Superimposition of

the solution structure of FOXO1-DBD (conf. no. 16, shown in dark cyan) with the crystal structure of the FOXO1-DBD:DNA complex (PDB ID: 3COA [7], shown in green). (**B**) Superimposition of the solution structure of FOXO3-DBD (conf. no. 11, PDB ID: 2K86 [46], shown in sand) with the crystal structure of the FOXO3-DBD:DNA complex (PDB ID: 2UZK [6], shown in brown). (**C**) Superimposition of the solution structure of FOXO4-DBD (conf. no. 3, PDB ID: 1E17 [45], shown in dark red) with the crystal structure of the FOXO4-DBD:DNA complex (PDB ID: 3L2C [8], shown in pink).

4. Conclusions

FOX proteins are found in all eukaryotic species where they play a central role in cellular proliferation, differentiation, tumorigenesis and longevity (reviewed in [53,54]). The FOX family comprises more than 100 members classified into 17 subclasses designated A–Q. The members of the FOXO subclass (FOXO1, FOXO3, FOXO4 and FOXO6) are involved in a wide range of key biological processes including apoptosis, cell cycle, stress resistance, tumor resistance, differentiation, and metabolism (reviewed in [15–17]). Whereas FOXO1, FOXO3 and FOXO4 are widely expressed, FOXO6 is expressed mainly in neural tissues and developing brain [55]. Previous studies have shown that FOXO1 regulates the transcription of numerous genes involved in anti-oxidative stress, cell cycle arrest, apoptosis, autophagy, and metabolic regulation under both physiological and pathophysiological conditions [56,57]. Several studies have also shown that FOXO1 is a key regulator of hepatic glucose production and lipid metabolism because the liver-specific deletion of FOXO1 increases insulin sensitivity, fasting hypoglycemia and lipogenesis, whereas constitutively active FOXO1 blocks the insulin-mediated reduction of hepatic glucose production [58–61]. Therefore, FOXO1 is considered as a promising therapeutic target for diabetic hyperglycemia. In addition, FOXO proteins (FOXO1, FOXO3 and FOXO4) are putative targets for prevention cancer therapy-related drug resistance. However, the development of specific FOXO inhibitors requires a detailed understanding of structural differences between individual FOXO-DBDs. The high-resolution structure of FOXO1-DBD and its comparison with structures of other FOXO proteins revealed differences in both their conformation and flexibility that may account for the distinct functions of FOXO proteins. In addition, the availability of the resonance assignment for DBD of all three major FOXO types will enable us to use solution NMR spectroscopy to easily screen and characterize FOXO-small molecule ligand complexes at the atomic level and to study the selectivity of prepared compounds for various FOXO proteins.

Supplementary Materials: The following are available online at http://www.mdpi.com/2073-4409/8/9/966/s1, Figure S1: ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of ^{15}N-labeled mouse FOXO1-DBD (residues 156-269), Figure S2: Difference residue-residue (RR) distance maps, Figure S3: Comparison of mutual positions of the α-helices H1, H2 and H3, Figure S4: Position of non-conserved residues in FOXO-DBD sequences, Figure S5: Comparison of apo FOXO1-DBD with the structure of the FOXO1-DBD:DNA complex, Table S1: Root-mean-square deviations (R.M.S.D.) for the superimposition of apo FOXO-DBD structures.

Author Contributions: K.P. and K.K. prepared protein samples for NMR measurements; K.P., K.K. and V.V. performed NMR measurements, data analysis and interpretation; V.O., M.J.A. and T.O. designed the research and wrote the manuscript. All authors discussed the results and commented on the manuscript. V.V., V.O. and T.O. supervised the research.

Funding: This research was funded by the Czech Science Foundation (Project 17-33854L), the Czech Academy of Sciences (Research Projects RVO: 67985823 of the Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences) and partly by the European Regional Development Fund; OP RDE; Project: ChemBioDrug (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000729).

Acknowledgments: We thank Carlos V. Melo for proofreading the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Weigel, D.; Jackle, H. The Fork Head Domain—A Novel DNA-Binding Motif of Eukaryotic Transcription Factors. *Cell* **1990**, *63*, 455–456. [CrossRef]

2. Kaestner, K.H.; Knochel, W.; Martinez, D.E. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev.* **2000**, *14*, 142–146. [PubMed]
3. Clark, K.L.; Halay, E.D.; Lai, E.; Burley, S.K. Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature* **1993**, *364*, 412–420. [CrossRef] [PubMed]
4. Tsai, K.L.; Huang, C.Y.; Chang, C.H.; Sun, Y.J.; Chuang, W.J.; Hsiao, C.D. Crystal structure of the human FOXK1a-DNA complex and its implications on the diverse binding specificity of winged helix/forkhead proteins. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 17400–17409. [CrossRef]
5. Stroud, J.C.; Wu, Y.; Bates, D.L.; Han, A.; Nowick, K.; Paabo, S.; Tong, H.; Chen, L. Structure of the forkhead domain of FOXP2 bound to DNA. *Structure* **2006**, *14*, 159–166. [CrossRef] [PubMed]
6. Tsai, K.L.; Sun, Y.J.; Huang, C.Y.; Yang, J.Y.; Hung, M.C.; Hsiao, C.D. Crystal structure of the human FOXO3a-DBD/DNA complex suggests the effects of post-translational modification. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 6984–6994. [CrossRef] [PubMed]
7. Brent, M.M.; Anand, R.; Marmorstein, R. Structural basis for DNA recognition by FoxO1 and its regulation by posttranslational modification. *Structure* **2008**, *16*, 1407–1416. [CrossRef]
8. Boura, E.; Rezabkova, L.; Brynda, J.; Obsilova, V.; Obsil, T. Structure of the human FOXO4-DBD-DNA complex at 1.9 A resolution reveals new details of FOXO binding to the DNA. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 1351–1357. [CrossRef] [PubMed]
9. Furuyama, T.; Nakazawa, T.; Nakano, I.; Mori, N. Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem. J.* **2000**, *349*, 629–634. [CrossRef]
10. Biggs, W.H., 3rd; Cavenee, W.K.; Arden, K.C. Identification and characterization of members of the FKHR (FOX O) subclass of winged-helix transcription factors in the mouse. *Mamm. Genome.* **2001**, *12*, 416–425. [CrossRef]
11. O'Brien, R.M.; Granner, D.K. Regulation of gene expression by insulin. *Physiol. Rev.* **1996**, *76*, 1109–1161. [CrossRef]
12. Streeper, R.S.; Svitek, C.A.; Chapman, S.; Greenbaum, L.E.; Taub, R.; O'Brien, R.M. A multicomponent insulin response sequence mediates a strong repression of mouse glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 11698–11701. [CrossRef]
13. Overdier, D.G.; Porcella, A.; Costa, R.H. The DNA-binding specificity of the hepatocyte nuclear factor 3/forkhead domain is influenced by amino-acid residues adjacent to the recognition helix. *Mol. Cell Biol.* **1994**, *14*, 2755–2766. [CrossRef]
14. Kaufmann, E.; Muller, D.; Knochel, W. DNA recognition site analysis of Xenopus winged helix proteins. *J. Mol. Biol.* **1995**, *248*, 239–254. [CrossRef]
15. Hornsveld, M.; Dansen, T.B.; Derksen, P.W.; Burgering, B.M.T. Re-evaluating the role of FOXOs in cancer. *Semin Cancer Biol.* **2018**, *50*, 90–100. [CrossRef]
16. Ma, J.; Matkar, S.; He, X.; Hua, X. FOXO family in regulating cancer and metabolism. *Semin Cancer Biol.* **2018**, *50*, 32–41. [CrossRef]
17. Tia, N.; Singh, A.K.; Pandey, P.; Azad, C.S.; Chaudhary, P.; Gambhir, I.S. Role of Forkhead Box O (FOXO) transcription factor in aging and diseases. *Gene* **2018**, *648*, 97–105. [CrossRef]
18. Brunet, A.; Bonni, A.; Zigmond, M.J.; Lin, M.Z.; Juo, P.; Hu, L.S.; Anderson, M.J.; Arden, K.C.; Blenis, J.; Greenberg, M.E. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **1999**, *96*, 857–868. [CrossRef]
19. Kops, G.J.; de Ruiter, N.D.; De Vries-Smits, A.M.; Powell, D.R.; Bos, J.L.; Burgering, B.M. Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* **1999**, *398*, 630–634. [CrossRef]
20. Brunet, A.; Kanai, F.; Stehn, J.; Xu, J.; Sarbassova, D.; Frangioni, J.V.; Dalal, S.N.; DeCaprio, J.A.; Greenberg, M.E.; Yaffe, M.B. 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J. Cell Biol.* **2002**, *156*, 817–828. [CrossRef]
21. Obsilova, V.; Vecer, J.; Herman, P.; Pabianova, A.; Sulc, M.; Teisinger, J.; Boura, E.; Obsil, T. 14-3-3 Protein interacts with nuclear localization sequence of forkhead transcription factor FoxO4. *Biochemistry* **2005**, *44*, 11608–11617. [CrossRef]
22. Silhan, J.; Vacha, P.; Strnadova, P.; Vecer, J.; Herman, P.; Sulc, M.; Teisinger, J.; Obsilova, V.; Obsil, T. 14-3-3 protein masks the DNA binding interface of forkhead transcription factor FOXO4. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 19349–19360. [CrossRef]

23. So, C.W.; Cleary, M.L. MLL-AFX requires the transcriptional effector domains of AFX to transform myeloid progenitors and transdominantly interfere with forkhead protein function. *Mol. Cell Biol.* **2002**, *22*, 6542–6552. [CrossRef]
24. Greer, E.L.; Brunet, A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* **2005**, *24*, 7410–7425. [CrossRef]
25. Vogt, P.K.; Jiang, H.; Aoki, M. Triple layer control: Phosphorylation, acetylation and ubiquitination of FOXO proteins. *Cell Cycle* **2005**, *4*, 908–913. [CrossRef]
26. van der Horst, A.; Burgering, B.M.T. Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biol.* **2007**, *8*, 440–450. [CrossRef]
27. Brunet, A.; Sweeney, L.B.; Sturgill, J.F.; Chua, K.F.; Greer, P.L.; Lin, Y.; Tran, H.; Ross, S.E.; Mostoslavsky, R.; Cohen, H.Y.; et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* **2004**, *303*, 2011–2015. [CrossRef]
28. van der Horst, A.; de Vries-Smits, A.M.; Brenkman, A.B.; van Triest, M.H.; van den Broek, N.; Colland, F.; Maurice, M.M.; Burgering, B.M. FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. *Nat. Cell Biol.* **2006**, *8*, 1064–1073. [CrossRef]
29. Calnan, D.R.; Brunet, A. The FoxO code. *Oncogene* **2008**, *27*, 2276–2288. [CrossRef]
30. Webb, A.E.; Kundaje, A.; Brunet, A. Characterization of the direct targets of FOXO transcription factors throughout evolution. *Aging Cell* **2016**, *15*, 673–685. [CrossRef]
31. Hui, R.C.; Francis, R.E.; Guest, S.K.; Costa, J.R.; Gomes, A.R.; Myatt, S.S.; Brosens, J.J.; Lam, E.W. Doxorubicin activates FOXO3a to induce the expression of multidrug resistance gene ABCB1 (MDR1) in K562 leukemic cells. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 670–678. [CrossRef]
32. Han, C.Y.; Cho, K.B.; Choi, H.S.; Han, H.K.; Kang, K.W. Role of FoxO1 activation in MDR1 expression in adriamycin-resistant breast cancer cells. *Carcinogenesis* **2008**, *29*, 1837–1844. [CrossRef]
33. Salcher, S.; Hagenbuchner, J.; Geiger, K.; Seiter, M.A.; Rainer, J.; Kofler, R.; Hermann, M.; Kiechl-Kohlendorfer, U.; Ausserlechner, M.J.; Obexer, P. C10ORF10/DEPP, a transcriptional target of FOXO3, regulates ROS-sensitivity in human neuroblastoma. *Mol. Cancer.* **2014**, *13*, 224. [CrossRef]
34. Karadedou, C.T.; Gomes, A.R.; Chen, J.; Petkovic, M.; Ho, K.K.; Zwolinska, A.K.; Feltes, A.; Wong, S.Y.; Chan, K.Y.; Cheung, Y.N.; et al. FOXO3a represses VEGF expression through FOXM1-dependent and -independent mechanisms in breast cancer. *Oncogene* **2012**, *31*, 1845–1858. [CrossRef]
35. Yao, S.; Fan, L.Y.; Lam, E.W. The FOXO3-FOXM1 axis: A key cancer drug target and a modulator of cancer drug resistance. *Semin Cancer Biol.* **2018**, *50*, 77–89. [CrossRef]
36. Pajvani, U.B.; Accili, D. The new biology of diabetes. *Diabetologia* **2015**, *58*, 2459–2468. [CrossRef]
37. Langlet, F.; Haeusler, R.A.; Linden, D.; Ericson, E.; Norris, T.; Johansson, A.; Cook, J.R.; Aizawa, K.; Wang, L.; Buettner, C.; et al. Selective Inhibition of FOXO1 Activator/Repressor Balance Modulates Hepatic Glucose Handling. *Cell* **2017**, *171*, 824–835 e818. [CrossRef]
38. Lee, W.; Tonelli, M.; Markley, J.L. NMRFAM-SPARKY: Enhanced software for biomolecular NMR spectroscopy. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 1325–1327. [CrossRef]
39. Renshaw, P.S.; Veverka, V.; Kelly, G.; Frenkiel, T.A.; Williamson, R.A.; Gordon, S.V.; Hewinson, R.G.; Carr, M.D. Sequence-specific assignment and secondary structure determination of the 195-residue complex formed by the Mycobacterium tuberculosis proteins CFP-10 and ESAT-6. *J. Biomol. NMR* **2004**, *30*, 225–226. [CrossRef]
40. Veverka, V.; Lennie, G.; Crabbe, T.; Bird, I.; Taylor, R.J.; Carr, M.D. NMR assignment of the mTOR domain responsible for rapamycin binding. *J. Biomol. NMR* **2006**, *36* (Suppl. 1), 3. [CrossRef]
41. Herrmann, T.; Guntert, P.; Wuthrich, K. Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle dynamics algorithm DYANA. *J. Mol. Biol.* **2002**, *319*, 209–227. [CrossRef]
42. Guntert, P.; Wuthrich, K. Improved efficiency of protein structure calculations from NMR data using the program DIANA with redundant dihedral angle constraints. *J. Biomol. NMR* **1991**, *1*, 447–456. [CrossRef]
43. Shen, Y.; Delaglio, F.; Cornilescu, G.; Bax, A. TALOS+: A hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *J. Biomol. NMR* **2009**, *44*, 213–223. [CrossRef]
44. Harjes, E.; Harjes, S.; Wohlgemuth, S.; Muller, K.H.; Krieger, E.; Herrmann, C.; Bayer, P. GTP-Ras disrupts the intramolecular complex of C1 and RA domains of Nore1. *Structure* **2006**, *14*, 881–888. [CrossRef]
45. Weigelt, J.; Climent, I.; Dahlman-Wright, K.; Wikstrom, M. Solution structure of the DNA binding domain of the human forkhead transcription factor AFX (FOXO4). *Biochemistry* **2001**, *40*, 5861–5869. [CrossRef]

46. Wang, F.; Marshall, C.B.; Yamamoto, K.; Li, G.Y.; Plevin, M.J.; You, H.; Mak, T.W.; Ikura, M. Biochemical and structural characterization of an intramolecular interaction in FOXO3a and its binding with p53. *J. Mol. Biol.* **2008**, *384*, 590–603. [CrossRef]
47. Kelley, L.A.; Gardner, S.P.; Sutcliffe, M.J. An automated approach for clustering an ensemble of NMR-derived protein structures into conformationally related subfamilies. *Protein Eng* **1996**, *9*, 1063–1065. [CrossRef]
48. Lee, B.; Richards, F.M. The interpretation of protein structures: Estimation of static accessibility. *J. Mol. Biol.* **1971**, *55*, 379–400. [CrossRef]
49. Pierrou, S.; Hellqvist, M.; Samuelsson, L.; Enerback, S.; Carlsson, P. Cloning and characterization of seven human forkhead proteins: Binding site specificity and DNA bending. *Embo J.* **1994**, *13*, 5002–5012. [CrossRef]
50. Martin, A.J.; Walsh, I.; Tosatto, S.C. MOBI: A web server to define and visualize structural mobility in NMR protein ensembles. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 2916–2917. [CrossRef]
51. Baar, M.P.; Brandt, R.M.C.; Putavet, D.A.; Klein, J.D.D.; Derks, K.W.J.; Bourgeois, B.R.M.; Stryeck, S.; Rijksen, Y.; van Willigenburg, H.; Feijtel, D.A.; et al. Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell* **2017**, *169*, 132–147 e116. [CrossRef]
52. Vacha, P.; Zuskova, I.; Bumba, L.; Herman, P.; Vecer, J.; Obsilova, V.; Obsil, T. Detailed kinetic analysis of the interaction between the FOXO4-DNA-binding domain and DNA. *Biophys. Chem.* **2013**, *184C*, 68–78. [CrossRef]
53. Golson, M.L.; Kaestner, K.H. Fox transcription factors: From development to disease. *Development* **2016**, *143*, 4558–4570. [CrossRef]
54. Benayoun, B.A.; Caburet, S.; Veitia, R.A. Forkhead transcription factors: Key players in health and disease. *Trends Genet.* **2011**, *27*, 224–232. [CrossRef]
55. Jacobs, F.M.; van der Heide, L.P.; Wijchers, P.J.; Burbach, J.P.; Hoekman, M.F.; Smidt, M.P. FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35959–35967. [CrossRef]
56. Xing, Y.Q.; Li, A.; Yang, Y.; Li, X.X.; Zhang, L.N.; Guo, H.C. The regulation of FOXO1 and its role in disease progression. *Life Sci.* **2018**, *193*, 124–131. [CrossRef]
57. Lu, H.; Huang, H. FOXO1: A potential target for human diseases. *Current drug targets* **2011**, *12*, 1235–1244. [CrossRef]
58. Nakae, J.; Biggs, W.H., 3rd; Kitamura, T.; Cavenee, W.K.; Wright, C.V.; Arden, K.C.; Accili, D. Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1. *Nat. Genet.* **2002**, *32*, 245–253. [CrossRef]
59. Matsumoto, M.; Han, S.; Kitamura, T.; Accili, D. Dual role of transcription factor FoxO1 in controlling hepatic insulin sensitivity and lipid metabolism. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 2464–2472. [CrossRef]
60. Matsumoto, M.; Pocai, A.; Rossetti, L.; Depinho, R.A.; Accili, D. Impaired regulation of hepatic glucose production in mice lacking the forkhead transcription factor Foxo1 in liver. *Cell Metab.* **2007**, *6*, 208–216. [CrossRef]
61. Cook, J.R.; Matsumoto, M.; Banks, A.S.; Kitamura, T.; Tsuchiya, K.; Accili, D. A mutant allele encoding DNA binding-deficient FoxO1 differentially regulates hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetes* **2015**, *64*, 1951–1965. [CrossRef]

© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).