

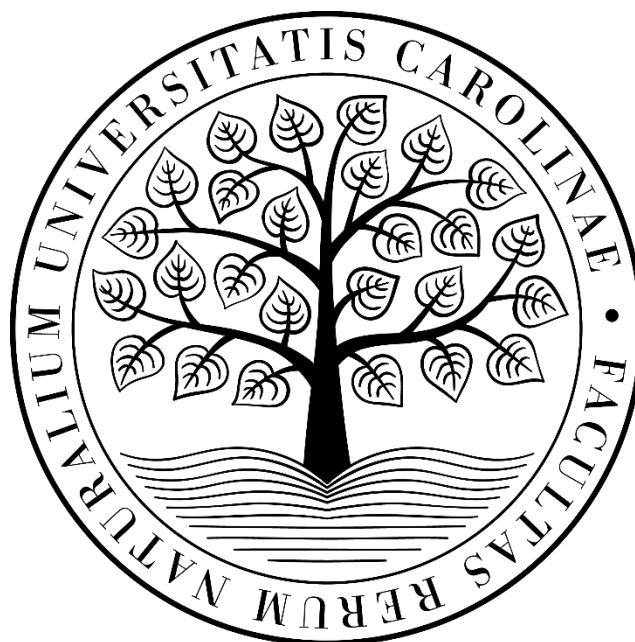
UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Lukáš Koblíček

Příprava DNA vazebné domény transkripčního faktoru FOXK2

Preparation of transcription factor FOXK2 - DNA binding domain

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Zdeněk Kukačka, Ph.D.

Praha 2021

Prohlášení:

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

V Praze dne:

Podpis:

Abstrakt

Transkripční faktory jsou specifické proteiny, které jsou schopny regulovat transkripci a které se na základě strukturních motivů dělí do jednotlivých rodin. Jednou z těchto rodin je i rodina FOX, do které se řadí i transkripční faktor FOXK2, jež byl předmětem studia této práce. Protein FOXK2 reguluje mnoho buněčných dějů včetně buněčné proliferace a metabolismu a má neméně důležitou roli při karcinogenezi, neboť jeho zvýšená exprese byla zaznamenána v případech rakoviny plic, jater a ledvin. V rámci této práce byla připravena DNA vazebná doména transkripčního faktoru FOXK2 rekombinantní expresí v buňkách *Escherichia coli*. Získaný protein byl poté purifikován a byla studována jeho interakce s DNA pomocí nativní hmotnostní spektrometrie.

Klíčová slova

transkripční faktor, FOX rodina, FOXK2, DNA vazebná doména, rekombinantní exprese

Abstract

Transcription factors are specific proteins, which are able to regulate transcription and which are divided into individual families based on structural motifs. One of these families is the FOX family, which also includes the transcription factor FOXK2, which was the studying subject of this work. The FOXK2 protein regulates many cellular processes, including cell proliferation and metabolism and plays an important role in carcinogenesis, as its high expression has been reported in cases of lung, liver and kidney cancer. In this work, the DNA binding domain of the transcription factor FOXK2 was prepared by recombinant expression of *Escherichia coli* cells. The obtained protein was afterwards purified and its interaction with DNA was studied by native mass spectrometry.

Key words

transcription factor, FOX family, FOXK2, DNA binding domain, recombinant expression

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli Mgr. Zdeňku Kukačkovi, Ph.D. za vedení bakalářské práce a zároveň za jeho ochotu, trpělivost a znalosti, které mi byly předány. Rád bych také poděkoval Bc. Tereze Kadavé za pomoc při přípravě vzorku a při samotném měření nativní hmotnostní spektrometrie. Velký dík patří i celému kolektivu laboratoře za poskytnutí přátelského prostředí a rad, kdykoli bylo potřeba. Závěrem bych chtěl poděkovat své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

Obsah

1. Teoretický úvod.....	11
1.1 Proteiny.....	11
1.1.1 Transkripční faktory	11
1.2 FOX rodina transkripčních faktorů	11
1.3 Transkripční faktor FOXK2	12
1.4 Transkripční aktivita FOXK2.....	13
1.4.1 Specifita vaznosti na chromatin.....	13
1.4.2 Interakce s BAP1.....	14
1.4.3. Buněčný metabolismus	15
1.4.3.1 Autofágie	15
1.4.3.2 Vliv na metabolismus glukosy.....	16
1.4.4. Methylace DNA	16
1.5 Funkce FOXK2 při opravě DNA a kontrole buněčného cyklu	17
1.5.1 Oprava DNA.....	17
1.5.2 Regulace buněčného cyklu	17
1.6 Onkogenní a tumor supresorová role FOXK2.....	19
1.6.1 Tumor supresor.....	19
1.6.2 Onkogen	21
1.7 Pohled na expresi FOXK2 u pacientů s rakovinou	22
2. Cíle práce.....	26
3. Materiály.....	27
3.1. Chemikálie.....	27
3.2 Přístroje a laboratorní vybavení	28
3.3 Bakteriální kmeny	30
3.4 Vektory a oligonukleotidy.....	30
3.5 Roztoky, pufrý a média	30

4. Metody.....	32
4.1 Transformace kompetentních buněk a příprava noční kultury	32
4.2 Produkce DNA vazebné domény FOXK2 ve velkém objemu média.....	32
4.3 Purifikace	33
4.3.1 Izolace proteinů z buněčné kultury	33
4.3.2 Afinitní chromatografie	33
4.3.3 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS..	33
4.3.4 Štěpení histidinové kotvy	34
4.3.5 Hmotnostně spektrometrická analýza produktů štěpení	34
4.3.6 Druhá afinitní chromatografie.....	34
4.3.7 Gelová permeační chromatografie	35
4.4 Analýza DNA vazebné domény FOXK2 s dvouvláknovou DNA.....	35
4.4.1 Nativní elektroforéza	35
4.4.2 Nativní hmotnostní spektrometrie.....	36
5. Výsledky.....	37
5.1 Afinitní chromatografie	37
5.2 Štěpení histidinové kotvy na N-konci.....	38
5.3 Druhá afinitní chromatografie	40
5.4 Gelová permeační chromatografie.....	41
5.5 Nativní elektroforéza	42
5.6 Nativní hmotnostní spektrometrie	43
6. Diskuze.....	45
7. Závěr.....	48
Seznam citované literatury	49

Seznam zkratek a symbolů

AP-1	aktivátorový protein-1
BAP1	tumor supresorový protein (z angl. BRCA1-associated protein 1)
BCA	bicincholinová kyselina
ccRCC	typ rakoviny ledvin (z angl. clear-cell renal cell carcinoma)
CDK	cyklin dependentní kinasy
CLB2	cyklin B2
CLNA	cyklin A
CpG ostrůvky	oblasti s vysokým výskytem cytosinu, fosfátu a guaninu
CRC	kolorektální rakovina
DNA	2-deoxyribonukleová kyselina
DBD	DNA vazebná doména (z angl. DNA binding domain)
dsDNA	dvouvláknová DNA (z angl. double-stranded DNA)
DVL	„dishevelled“ proteiny
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
EMT	epiteliálně mezenchymální přechod
ER α	estrogenový receptor alfa
ESI	ionizace elektrosprejem (z angl. electrospray ionization)
EWAS	epigenetická studie (z angl. epigenome-wide association study)
FHA	forkhead doména
Fos	proteinová podjednotka AP-1
FOX	rodina transkripčních faktorů obsahujících „forkhead box“ doménu
H2A	histonový protein

HCC	hepatocelulární rakovina
HCF-1	transkripční regulátor (z angl. host cell factor 1)
HDAC1	histon deacetylase 1
HEPES	(4-(2-hydroxyethylamino)-1-piperazin) ethansulfonová kyselina
HIF1 α	hypoxií indukovatelný transkripční faktor 1 alfa
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (z angl. Human Immunodeficiency Virus)
HPV	lidský papilomavirus (z angl. Human papillomavirus)
ChIP-seq	chromatinová imunoprecipitační sekvenační analýza
IHC	imunohistochemie
IL-2	interleukin-2
ILF	interleukin vazebný faktor
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid
LB	médium pro kultivaci bakterií (z angl. Luria-Bertani broth)
LTR	dlouhá konečná repetice (z angl. long terminal repeat)
MBD	methyl vazebná doména (z angl. methyl binding domain)
MWCO	hodnota limitu molekulové hmotnosti (z angl. molecular weight cut off)
mRNA	messenger RNA
mTOR	savčí varianta proteinu TOR (z angl. mammal target of rapamycin)
mTORC1	savčí varianta komplexu TOR1
NFAT	komplex proteinů aktivovaných T- lymfocytů (z angl. nuclear factor of activated T-cells)
nGTBP	specifický „G/T-mismatch“ vazebný protein
NNMT	nikotin N-methyltransferasa
NSCLC	nemalobuněčná rakovina plic (z angl. non-small cell lung cancer)

NSL	jaderný lokalizační signál (z angl. nuclear localization signal)
PR-DUB	polykombní represivní deubikvitinázový komplex
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforetická separace v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného
SOX9	transkripční faktor rozhodující o pohlaví (z angl. sex-determining region Y box 9)
ssDNA	jednovláknová DNA (z angl. single-stranded DNA)
TBE	Tris-borátový pufr s přídavkem EDTA
TCGA	Atlas rakovinového genomu (z angl. The Cancer Genom Atlas)
TEMED	1,2-bis(dimethylamino)ethan
TET hydroxylasy	enzymy z TET (ten-eleven translocation) rodiny
TFA	trifluoroctová kyselina
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
U2OS	buňky lidského osteosarkomu

1. Teoretický úvod

1.1 Proteiny

Proteiny jsou biopolymery složené z aminokyselin propojených peptidovou vazbou [1]. V lidském těle plní proteiny celou řadu funkcí stavební, zásobní, transportní, zprostředkovávají imunologickou odpověď organismu aj. K tomu aby došlo k jejich zužitkování, jsou degradovány na aminokyseliny. Rozlišujeme 22 proteinogenních aminokyselin, z čehož deset jich je pro lidský organismus neesenciálních a další dvě semiesenciální [2]. Ty mohou být využity k syntéze nejen proteinů, ale i kreatinu, nukleotidů, hormonů, neurotransmiterů a dalších důležitých metabolitů organismu [1].

S proteiny je úzce spjat pojem transkripce, což je proces, při kterém dochází k přepisu DNA do RNA. Jedná se o krok při genové expresi, který je následován posttranskripčními modifikacemi a translací. Výsledným produktem je funkční protein. Transkripce hraje také roli ve specifitě, jelikož v každé tkáni dochází k tvorbě jiných proteinů [3].

1.1.1 Transkripční faktory

Samotná transkripce je regulována pomocí specifických proteinů tzv. transkripčních faktorů. K regulaci dochází navázáním transkripčních faktorů na speciální místo na DNA, v čemž hraje zásadní roli jejich struktura. Na základě odlišností v těchto strukturách jsou transkripční faktory rozděleny do jednotlivých rodin. Vazba na DNA je podstatná, ale není dostačující k tomu, aby ovlivnila transkripci, jelikož následně musí dojít k interakci transkripčního faktoru s dalšími transkripčními faktory nebo RNA polymerasou. Při této interakci dochází ve většině případů k aktivaci transkripce, ale již byla zaznamenána i její represe [3].

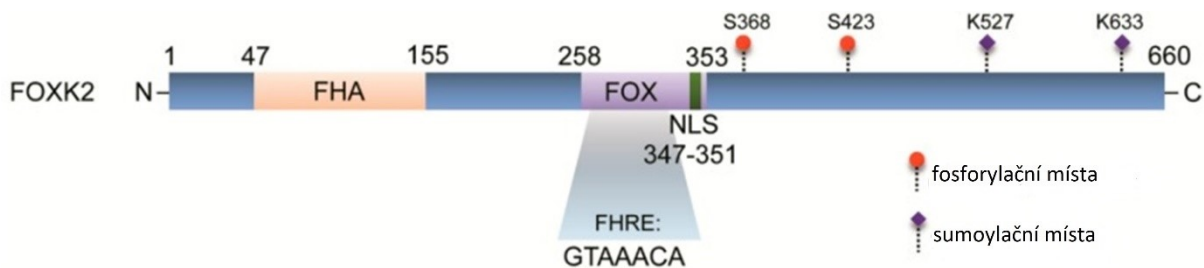
1.2 FOX rodina transkripčních faktorů

Do „forkhead-box“ (FOX) rodiny patří transkripční faktory, které se dělí do několika podtříd pomocí písmen a v každé podtřídě jsou mezi sebou rozlišeny arabskou číslicí [4]. Proteiny z této rodiny jsou typické svou „winged helix“ DNA vazebnou doménou složenou ze sta aminokyselin, která je tvořena motivem helix-ohyb-helix s dvěma typickými smyčkami, které připomínají křídla a od nichž byl odvozen její název. Původně byl *forkhead gen* objeven u *Drosophila melanogaster* a následně byly identifikovány geny příbuzné tzv. *FOX geny*, které kódují transkripční faktory nacházející se v mnoha organismech, od kvasinek po člověka [5,6]. K funkci těchto genů se řadí regulace biologických procesů a to během vývoje i dospělosti včetně regulace gastrulace, metabolismu a kontroly buněčného cyklu [6]. FOX transkripční faktory jsou podstatné pro správnou specifikaci, diferenciaci a funkci tkání jako jsou játra,

vaječníky, plíce, ledviny a mnohé další. Mutace genů FOX jsou spojeny s lidskými chorobami, jako je například rakovina či Parkinsonova choroba a v mnoha případech je nepřítomnost jediného transkripčního faktoru smrtelná [6].

1.3 Transkripční faktor FOXK2

Jedním ze zástupců rodiny FOX je i transkripční faktor FOXK2, který je složený z 660 aminokyselin a jež obsahuje ve své struktuře forkhead doménu (FHA), FOX doménu a uvnitř ní jaderný lokalizační signál (NLS) (obr. 1) [7]. FHA domény jsou fosforylované aminokyselinové motivy nacházející se u eukaryot a eubakterií a jsou jedinou skupinou, která má výraznou specifitu pro fosfothreoninové zbytky (obr. 2). Tisíce proteinů obsahujících tuto doménu jsou zapojeny do důležitých buněčných procesů jako je například růst buněk, signální transdukce, odpověď organismu při poškození DNA a regulace buněčného cyklu [8]. FHA doména se vyskytuje i u proteinu FOXK1, přičemž se ukázalo, že se tento protein shoduje v aminokyselinové sekvenci s FOXK2 z 48,7 % [9].



Obrázek 1- Doménová struktura FOXK2 s vyznačenými místy pro fosforylaci (S) a sumoylaci (K). Upraveno dle [7]



Obrázek 2 - FHA doména Rad53 s navázaným fosfopeptidem (zeleně) s postranními řetězci (červeně). Upraveno dle [8]

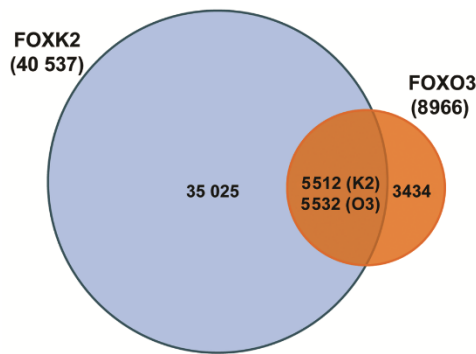
Na základě homologie u DNA vazebných domén pro interleukin enhancer vazebný faktor (ILF) a forkhead nalezené při hledání genů kódujících buněčné faktory, které se váží na motivy bohaté na puriny v HIV dlouhé konečné repetici (LTR), byl FO XK2 popsán jako interleukinový enhancer vazebný faktor [7,10]. Dále byla objevena schopnost FO XK2 vázat se na promotor interleukinu 2 (IL-2) [10]. I přes tuto možnost vazby na IL-2 promotor nebylo zaznamenáno, že by FO XK2 byl součástí nebo přímo interagoval s komplexem proteinů aktivovaných T-lymfocytů (NFAT), který je zásadní pro syntézu mRNA IL-2 [11]. Na promotor se váže převážně v T-lymfocytech v klidovém stavu a může dojít k přenosu transkripčních faktorů potřebných k aktivaci transkripce. Také má svou roli při regulaci změny struktury chromatinu, přičemž taková změna následně usnadní aktivaci transkripce zprostředkovanou NFAT proteiny [11].

Gen *FO XK2* se nachází na lidském chromozomu 17q25.3 a kolektiv Hackmanna a spol. prokázal u desetiletého dítěte částečnou tetrasomii tohoto chromosomu, jehož narušení je spjato s mentálními poruchami, malformacemi, syndaktyliemi a nízkou postavou postiženého jedince [12]. Také bylo poukázáno na to, že *FO XK2* gen může být methylován na tzv. CpG ostrůvcích (oblasti s vysokým výskytem cytosinu, fosfátu a guaninu) tukové tkáně, což je spjato s hladinou nikotin N-methyltransferasy (NNMT). Po úbytku hmotnosti bylo u pacientů pozorováno snížení exprese NNMT a genů souvisejících se zánětem a zároveň i změna v expresi FO XK2 [13].

1.4 Transkripční aktivita FO XK2

1.4.1 Specifita vaznosti na chromatin

FO XK2 se váže na sekvence s jaderným motivem GTAAACA (obr. 1, str. 12) a celkově vykazuje podobnou vazebnou specifitu jako FO XO3, z čehož vyplývá jejich vaznost na stejné genomové oblasti. Specifita u FO XK2 je ještě navíc ovlivněna sekvencí lemující jadernou oblast, na kterou se mohou oba proteiny vázat. Byly zaznamenány rozsáhlé překryvy (obr. 3) při vazbě na chromatin i přes rozdílnou specifitu vazby na DNA a také role obou proteinů při regulaci genové exprese závislé na FO XO3. Zároveň patří mezi FO X proteiny, které jsou nejvíce exprimovány v U2OS buňkách, což jsou buňky lidského osteosarkomu [14].

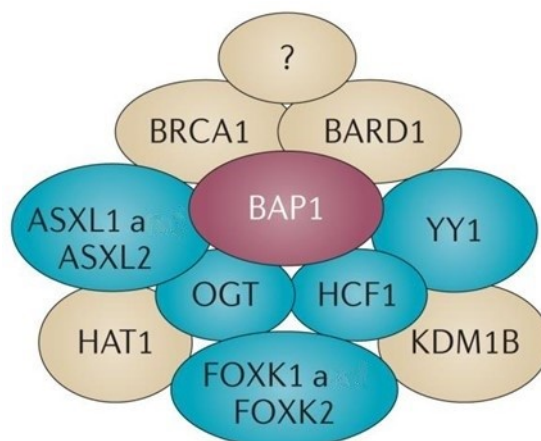


Obrázek 3 - Sdílené překrývající se vazebné oblasti mezi FOXK2 a FOXO3. Upraveno dle [14]

Byly provedeny chromatinové imunoprecipitační sekvenační (ChIP-seq) analýzy za účelem nalezení oblastí genomu, které jsou obsazené FOXK2 in vivo a bylo zjištěno, že FOXK2 vazebné oblasti jsou rozšířené v celém genomu lidských buněk. Geny spojené s oblastmi, na které se váže, souvisejí se signálními drahami spojenými s buněčnou adhezí a motilitou, kontrolou transkripce a metabolismu a apoptózou. Z výzkumu také vyšlo najevo, že vazebné oblasti FOXK2 obsahují vazebné motivy transkripčního faktoru aktivátorového proteinu-1 (AP-1), a to zejména v oblastech s euchromatinem. FOXK2 pozitivně ovlivňuje genovou expresi závislou na AP-1 a zároveň jeho aktivitu. Při úbytku FOXK2 došlo ke snížení vaznosti složky Fos, která je součástí AP-1, z čehož vyplývá, že FOXK2 může podporovat transkripční aktivitu a je nutný pro získávání AP-1 na chromatin [15]. AP-1 zprostředkovává genovou regulaci v reakci na širokou škálu podnětů a řídí buněčné procesy zapojené především do rozhodování o osudu buněk, tudíž může mít FOXK2 důležitou roli při změnách v genové expresi závislé na signálu [15,16].

1.4.2 Interakce s BAP1

Bylo prokázáno, že dalším partnerem interagujícím s FOXK2 je BAP1 (obr. 4, str.15), což je důležitý tumor supresorový protein, který je součástí komplexu PR-DUB [17]. Tento komplex má důležitou funkci při deubikvitinaci histonu H2A [18]. Mutace FOXK2 využita při výzkumu poukázala na její vliv na fosfát-dependentní interakce a dále na důležitost FHA domény při zprostředkování interakce mezi BAP1 a FOXK2. Aby k této interakci došlo, musí být BAP1 strukturně netknutý a vazba je uskutečněna přes N-konec FHA domény FOXK2 a threonin 493 na BAP1 [17,19]. Spolupráce těchto proteinů má roli při transkripční regulaci a FOXK2 slouží i jako přenašeč BAP1 na chromatin, čímž podporuje lokální histonovou deubikvitinaci [17]. Oproti tomu BAP1 přenáší HCF-1 a vytváří ternární komplex, ve kterém je i FOXK2 a došlo k potlačení aktivace cílových genů. Jako antagonistu působí Ring1B E3 ubikvitin ligasa, která při nedostatku BAP1 způsobuje zvýšení regulace FOXK2 cílových genů [19].



Obrázek 4 - Proteinoví partneři BAP1. Upraveno dle [18]

1.4.3. Buněčný metabolismus

1.4.3.1 Autofágie

Kromě PR-DUB FOXK2 interaguje také s proteiny ze Sin3A komplexu a může potlačovat transkripci pomocí jeho složky histon deacetylasy (HDAC1), což vede k histonové deacetylaci [17]. Další experimenty na myších myoblastech a lidských fibroblastech potvrdily schopnost interagovat s komplexem Sin3A, ale ne Sin3B. FOXK2 je schopen potlačovat genovou expresi u genů podílejících se na atrofii a autofágii, ale při jeho úbytku dochází ke zvýšení regulace cílových genů. K napodobení hladovění buňky byla využita savčí varianta proteinu TOR (mTOR) a ze získaných výsledků bylo zjištěno, že aktivace mTOR usnadňuje jaderný import FOXK1, zatímco jeho inhibice způsobena například hladověním, tento import blokuje. Fosforylované motivy mTOR jsou uloženy mezi FOXK1 a FOXK2, což naznačuje, že subcelulární poloha FOXK2 může být regulována podobně a hladověním bylo také zapříčiněno, že jak FOXK1, tak FOXK2 byly z chromatinu přemístěny [20].

Kolektivem Bowmana bylo stanoveno, že kromě zvýšení účinnosti translace, mTORC1 také reguluje hladinu hypoxií indukovatelného transkripčního faktoru 1 alfa (HIF1 α) pomocí mechanismu zprostředkovaného FOXK1 a 2. Takto dochází k ovlivnění metabolismu glukosy a buněčné proliferace. Další pozorovanou rolí FOXK1 a 2 byla regulace transkripce HIF1 α a buněčná proliferace u RT-4 buněk karcinomu močového měchýře. Snížení hladiny FOXK1 nebo FOXK2 vedlo ke snížení hladiny HIF1 α , přičemž nepřítomnost obou proteinů způsobila ještě větší pokles. Z toho vyplynulo, že snížení exprese FOXK1 i 2 potlačuje buněčnou proliferaci [21]. Úbytek FOXK2 také způsobil snížení exprese FOXK1 a z tohoto důvodu mohou FOXK1 a FOXK2 hrát nadbytečnou roli při regulaci svých cílových genů. Ať už úbytek FOXK2, FOXK1 či obou zvýšil autofágický tok přibližně na stejnou úroveň, z čehož lze usoudit, že FOXK proteiny potlačují autofágické procesy [20].

1.4.3.2 Vliv na metabolismus glukosy

V nedávné studii Sukoniny a spol. byl zkoumán vliv FOXK2 na aerobní glykolýzu. Pokusy byly prováděny na myších, které byly vyhladověny, přičemž výsledky ukázaly, že ke zvýšení regulace FOXK1 a FOXK2 došlo ve svalové a tukové tkáni, také v kosterním svalstvu po cvičení a v tukové tkáni u obézních myší. Zvýšená exprese obou proteinů způsobila zvýšení absorpce glukosy v adipocytech, myoblastech a myotubulech. Výsledky ukázaly, že glykolýza byla vyvolána zvýšenou expresí FOXK1 a FOXK2 a poukazují na jejich roli při regulaci glykolytických enzymů a pyruvátdehydrogenasa kinasy. Zároveň dochází ke zvýšení produkce laktátu a inhibici oxidace pyruvátu v mitochondriích, místo které je pyruvát redukován na již zmiňovaný laktát. Naopak při snížení exprese jsou všechny procesy zvráceny. Při snižování a zvyšování exprese FOXK1 nebo FOXK2 byly objeveny společné cílové geny s podobnou expresí, z čehož vyplývá, že proteiny spolupracují při regulaci několika různě exprimovaných genů. Důležitým zjištěním bylo také to, že FOXK1 a FOXK2 mají roli při řízení glukosy in vivo a to při podmínkách, které nezahrnovaly hladovění. Tento závěr byl stanoven z výsledků získaných z myší postrádající expresi FOXK2. Tyto myši měly nižší hladinu laktátu v krvi, zvýšenou hladinu glukosy a insulinu a snížila se jim váha. Také byla zaznamenána snížená absorpce glukosy v několika tkáních včetně té svalové. Při provedení těchto pokusů na lidských adipocytech byly získány podobné výsledky, kdy při nadměrné expresi FOXK2 došlo ke zvýšené absorpci glukosy, vyvolání aerobní glykolýzy a zvýšení produkce laktátu. Jelikož hraje aerobní glykolýza důležitou roli v tumorech a aktivaci T-lymfocytů, je tedy při těchto procesech předpokládána i role FOXK1 a FOXK2 [22].

1.4.4. Methylace DNA

Kromě vztahu FOXK2 s chromatinem byla také zkoumána jeho schopnost vázat se na methylovanou DNA. Tato schopnost byla potvrzena dvěma studii, přičemž ale každá uvádí jiné preference v modifikaci. Jedna popisuje vaznost proteinů s „winged helix“ doménou na 5-methylcytosin [23], zatímco druhá vaznost FOXK2 na 5-formylcytosin, který vzniká oxidací 5-methylcytosinu za působení TET hydroxylas, a tento derivát hraje roli při demethylaci DNA [24]. Dále se zkoumala vaznost FOXK2 na methyl vazebnou doménu (MBD), o které je známo, že je odpovědná za čtení methylace DNA a proteiny patřící do této rodiny se přednostně váží na 5-methylcytosin [25]. FOXK2 funkčně interaguje konkrétně s PR-DUB a MBD6, který spolu s nimi obsazuje část cílových genů. MBD5 a MBD6 byly popsány jako proteiny interagující s PR-DUB komplexem skrze svou MBD doménu a bylo také poukázáno na přenos MBD6, ne MBD5, na místa s poškozením DNA v závislosti na PR-DUB [26].

1.5 Funkce FOXK2 při opravě DNA a kontrole buněčného cyklu

Bylo prokázáno, že FOXK2 je spojen se třemi důležitými molekulárními faktory vzniku rakoviny: úpravy při regulaci exprese genů, narušení regulace buněčného cyklu a procesu opravy DNA. Po těchto zjištěních lze uvažovat o FOXK2 jako o kandidátovi na účast v tumorigenezi [7].

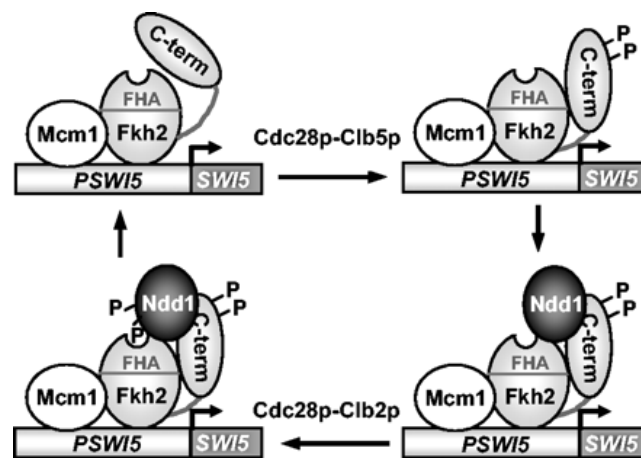
1.5.1 Oprava DNA

Kolektiv Fujiiho popsal FOXK2 jako specifický „G/T-mismatch“ vazebný protein (nGTBP). Bylo prokázáno, že FOX2 se váže s vysokou afinitou na „G/T-mismatched DNA“ pomocí FOX domény s vysokou specificitou [27]. Vzhledem k tomu, že korekce párování bází v DNA je zásadním krokem při ochraně před mutacemi, tak by FOXK2 mohl mít funkci při zajištění přesnosti replikace a genomické stability [7,27]. Jelikož FOXK2 neobsahuje katalytickou doménu, kterou obvykle nalezneme u proteinů sloužících k opravě DNA, vychází se z předpokladu, že do opravných kaskád je schopný zasahovat skrze svou FHA doménu [7]. Jak už bylo zjištěno dříve FOXK2 interaguje s BAP1 [17], což je protein, jehož funkce je koordinována fosforylací a pomáhá buňce zotavit se po poškození DNA. BAP1 je získáván na místa, kde je porušena dvoušroubovice DNA a podporuje její bezchybnou opravu [28]. Tato zjištění svědčí o tom, že FOXK2 a BAP1 navzájem spolupracují a hrají roli nejen při remodelaci chromatinu a kontrole genové exprese, ale i opravných drah DNA. Ve výsledku lze uvažovat o účasti FOXK2 při procesu opravy DNA. Zapojit se může vazbou na poškozená místa DNA, interakcí s molekulami, které jsou součástí kaskády oprav a získáním komplexů potřebných při iniciaci této signální cesty [7].

1.5.2 Regulace buněčného cyklu

Další role a to při regulaci buněčného cyklu byla zaznamenána u proteinů kvasinek Fkh1 a Fkh2, jedná se o homology lidských FOXK1 a FOXK2. Fkh2 byl spojen s pseudohyfálním růstem a oba proteiny jsou exprimovány během S-fáze, aby následně napomohly s regulací genů exprimovaných při přechodu z M-fáze [29]. Poté bylo také objeveno, že Fkh2 je cílem cyklin dependentních kinas, konkrétně Cdc28p, a jeho fosforylace podporuje interakce s koaktivátorem Ndd1p (obr. 5, str. 18). Tato interakce hraje důležitou roli při expresi CLB2 klastru a transkripci regulovanou buněčným cyklem. Navíc fosforylace Ndd1p je důležitá pro jeho získávání a aktivaci komplexu s Fkh2 [30]. Ndd1 je terčem polo kinasy Cdc5, která je

získávána dočasně do promotoru CLB2 genového klastru, a tato fosforylace je nutná pro expresi některých genů [31].



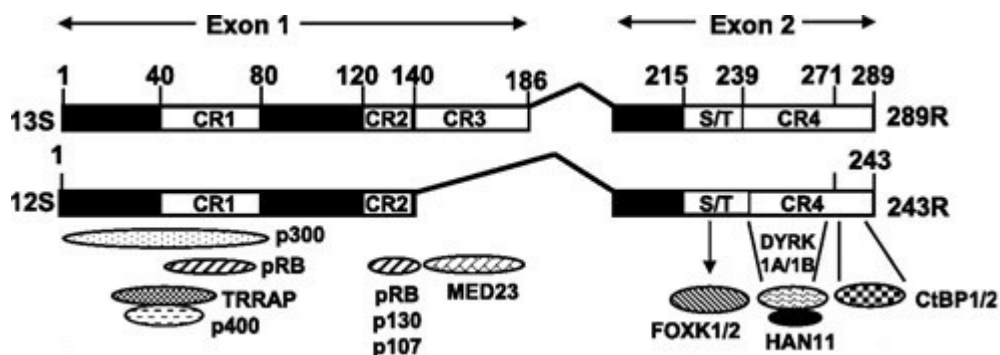
Obrázek 5 - Schéma průběhu regulace Fkh2 a Ndd1 komplexu Cdc28p-Clb2p. Upraveno dle [30]

Marais a spol. již popisují regulaci FOXK2 pomocí CDK-cyklin komplexů u savců. FOXK2 je exprimován v U2OS buňkách, v jejichž jádře se také nachází, zatímco výskyt v cytoplasmě je minimální. Exprese probíhá během buněčného cyklu a během něho hladiny fosforylovaného FOXK2 kolísají. Během mitózy je dočasně odstraněn z DNA, což je spjato s nízkou vazností na cílový gen MCM3. Bylo ověřeno, že FOXK2 je fosforylován během pozdějších fází buněčného cyklu a nejvyšší hodnoty byly zaznamenány při mitóze. Během této fáze hlavním cyklinovým komplexem působícím na FOXK2 je CDK1 a cyklin B in vivo. Následně bylo při experimentech, při kterých došlo ke snížení siRNA, také zachyceno, že fosforylaci ovlivňuje i CDK2 a cyklin A, což naznačuje, že fosforylace může probíhat před mitózou. Jako fosforylační místa na FOXK2 byly označeny serin 368 a 423 pomocí CDK-CLNA komplexu in vitro a přispívají k fosforylaci in vivo. FOXK2 se projevuje jako transkripci potlačující protein a jeden z jeho cílů je regulátor buněčného cyklu p21. Fosforylace také ovlivňuje stabilitu FOXK2, přičemž forma fosforylovaná je méně stabilní, transkripční aktivitu a degradaci. Nakonec se došlo ke zjištění, že pokud je zabráněno fosforylaci u mutantní formy FOXK2, je snížena životaschopnost buňky následovaná apoptózou [32].

Rovněž byl zkoumán vliv aktivního a pasivního mechanického stresu a stresu tepelného na metabolismus. V konečném výsledku se prokázalo, že pouze pasivní mechanický stres zvyšuje regulaci FOXK2, který má vliv na Wnt cestu, která je spojena s myogenezí, diferenciací svalových vláken a získáváním satelitních buněk na místa poranění [33].

1.6 Onkogenní a tumor supresorová role FOXK2

Role FOXK2 jako supresoru buněčné transformace a proliferace vychází ze zjištění, že dochází k interakci mezi C-koncovou doménou E1A, která je součástí adenoviru, a FOXK2 (obr. 6). Jako motivy zprostředkovávající interakci pravděpodobně s FHA doménou FOXK2 jsou identifikovány takové sekvence obsahující serin a threonin a zároveň je jejich interakce ovlivněna fosforylací E1A. S podobným motivem také interagují E6 proteiny obsažené ve dvou papilomavirech HPV14 a HPV21. Tyto podtypy HPV kódující protein E6 jsou spojeny s benigními kožními lézemi. Lze usuzovat, že interakce mezi E6 a FOXK2 může mít vliv na rovnováhu mezi proliferací a diferenciací, což vede ke vzniku optimálního prostředí pro virovou replikaci v epiteliálních buňkách [34].



Obrázek 6 - Interakce buněčných proteinů s E1A. Upraveno dle [34]

Expres FOXK2 byla zachycena ve všech buněčných liniích v proliferujících tkáních zkoumaných van der Heidem a spol., kteří došli k závěru, že snížení exprese FOXK2 má za následek snížení proliferace a vyvolává apoptózu, což poukazuje na důležitou funkci tohoto proteinu při buněčné proliferaci a přežití [35].

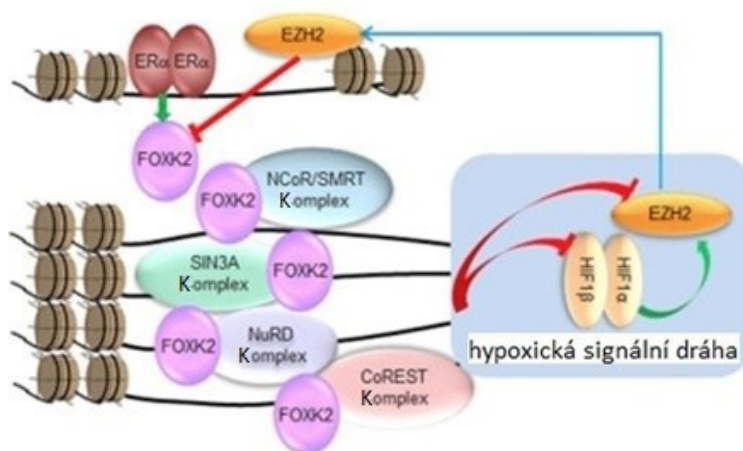
1.6.1 Tumor supresor

Studiem zaměřeným na roli FOXK2 v rakovině bylo ukázáno, že je schopný interagovat s estrogenovým receptorem alfa ($ER\alpha$), jedná se o regulátor během vývoje rakoviny prsu, a inhibovat transkripci tím, že zesiluje degradaci $ER\alpha$ zprostředkovanou ubikvitinem. Při tomto procesu dochází k interakci mezi FOXK2 a BRCA1/BARD1, což je E3 ubikvitin ligasa $ER\alpha$, a FOXK2 současně váže BRCA1/BARD1 a $ER\alpha$. To ve výsledku zapříčinilo snížení transkripční aktivity. Při zvýšené expresi FOXK2 došlo k inhibici transkripční aktivity $ER\alpha$, snížení transkripci cílových genů $ER\alpha$ a potlačení proliferace pozitivních $ER\alpha$ buněk rakoviny prsu. Tato zjištění vyvozují, že FOXK2 může mít negativní vliv jako regulátor $ER\alpha$ [36].

Další studie tyto vlastnosti FOXK2 potvrzují a poukazuje na jeho podstatnou roli při zprostředkování odpovědi na cytotoxické účinky léků u buněk rakoviny prsu. Indukce FOXK2

zprostředkovává aktivaci tumor supresoru FOXO3a a váže se na jeho promotor. Bylo také objeveno, že je protein FOXK2 deregulován a exprimován ve vysokých hladinách v jádře u lékově rezistentních buněk, ve kterém se poté hromadí a není jej možné získávat do cílových genů včetně FOXO3a [37]. V této souvislosti bylo zkoumáno, jakou roli odehrává sumoylace při modulaci lékové citlivosti způsobené FOXK2. Byly nalezeny dva sumoylační motivy v jeho sekvenci (lysín 527 a 633). Pomocí mutace FOXK2 na lysinu 527 a 633 bylo zjištěno, že se jedná o hlavní místa pro sumo konjugaci a FOXK2 může být modifikováno sumoylací. Sumoylace FOXK2 zprostředkovává cytotoxickou funkci a potlačuje transkripční aktivitu FOXK2 v buňkách rakoviny prsu, což je spjato s neschopností vázat na sebe cílové geny. Tato zjištění nám mohou přiblížit, jak je FOXK2 regulováno posttranslačními modifikacemi [38].

Při dalším zkoumání funkcí FOXK2 v karcinogenezi prsu bylo odhaleno, že dochází ke zvýšení buněčné proliferace při snížení exprese FOXK2, dále k vyvolání epiteliálně-mezenchymálního přechodu (EMT) a k zvýšení migrace a invaze u rakovinových buněk prsu. Byla prozkoumána role i ve vývoji a progresu u rakoviny prsu in vivo. Byly využity buňky MDA-MB-231, které vykazují nízkou expresi FOXK2 a které byly infikovány a následně implantovány do myši. Byl pozorován rychlejší růst nádoru a vznik metastáz v játrech a ledvinách. FOXK2 je spojován s mnoha komplexy korepresorů: NCoR/SMRT, SIN3A, NuRD a REST/CoREST, přičemž za interakci s nimi je zodpovědná FHA doména in vivo. Celkově získaná data poukazují na to, že FOXK2 v interakci s komplexy potlačuje karcinogenezi prsu pomocí cílení na hypoxické dráhy a je transaktivován ER α v rakovinových buňkách prsu. Kolektiv Shana tedy předvedl funkci FOXK2 jako represoru a tumor supresoru (obr. 7) [39].



Obrázek 7 - Schématické znázornění tumor supresorové role FOXK2 u rakoviny prsu. Upraveno dle [39]

Neméně byla zkoumána role FOXK2 u buněk karcinomu ledvin (ccRCC). U těchto buněk byla zaznamenána nízká hladina mRNA FOXK2 i samotného proteinu v porovnání s nenádorovými tkáněmi. FOXK2 potlačuje buněčnou proliferaci, migraci a invazní schopnosti buněk a vyvolává apoptózu in vitro. Nicméně bylo objeveno, že nadměrná exprese FOXK2 způsobuje inhibici nádorového růstu a podporuje apoptózu in vivo. Pomocí analýzy bylo zjištěno, že exprese EGFR, tyrosin kinasový receptor, je regulována FOXK2. Výsledky poukázaly, že za pomoci inhibice EGFR v ccRCC, je FOXK2 schopen potlačovat maligní fenotyp a vyvolávat apoptózu. Přesto je ještě potřeba tento mechanismus blíže prozkoumat [40].

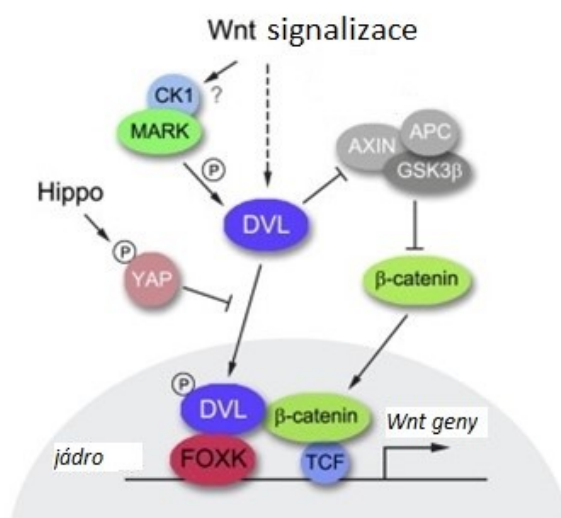
Údaje získané při výzkumu role FOXK2 u rakoviny žaludku poukázaly na jeho schopnost potlačit proliferaci, migraci a invazi rakovinových buněk žaludku. Jeho snížení mělo za následek zvýšení exprese N-kadherinu a snížení E-kadherinu. Byla představena možnost využití FOXK2 jako nádorového supresoru, zatímco jeho nedostatek může vyvolat růst rakovinových buněk [41]. Data získaná kolektivem Wang popisuje podobné výsledky, kdy při nedostatku FOXK2 došlo ke zvýšení buněčné proliferace, invaze a migrace u gliomů a při zvýšené expresi tomu bylo naopak. Stejně tak bylo pozorováno zvýšení exprese E-kadherinu a snížení N-kadherinu a vimentinu, což souvisí s inhibicí EMT u gliomů a z toho FOXK2 vychází jako hlavní prostředník těchto procesů [42]. Při snížení regulace FOXK2 pro získání cílových genů došlo ke zvýšení exprese u proteinů CDH2, Snail, CCND1 a CDK4 a naopak při zvýšení regulace nastala situace opačná. Výsledně bylo stanoveno, že se FOXK2 chová jako tumor supresor i u nemalé rakoviny plic [43].

Ve studii EWAS zkoumající hladinu nikotinu a jeho metabolitů se došlo k závěru, že *gen FOXK2* je u kuřáků methylován v kolujících leukocytech [44]. Z toho je možné vyvodit vliv epigenetických modifikací na umlčení genové exprese FOXK2 a to může mít dopady na patogenezi plic [7].

1.6.2 Onkogen

Některé studie také poukazují na roli FOXK2 jako onkogenu. Bylo dokázáno, že FOXK2 interaguje s DVL a pozitivně reguluje Wnt/ β -katenin signální dráhu tím, že přenáší DVL do jádra (obr. 8, str. 22). Tato interakce je závislá na fosforylaci DVL, která je vyvolána Wnt3A. Zvýšená hladina FOXK2 byla pozorována u kolorektální rakoviny a souvisí s umístěním jaderného DVL. U dvou buněčných linií s rakovinou tlustého střeva zapříčinila ztráta FOXK2

inhibici buněčné proliferace a nádorový růst. Naopak jeho podmíněná exprese vyvolala u myši střevní hyperproliferaci. Celkově výsledky zachycují možnou onkogenní roli FOXK2 [45].



Obrázek 8 - Grafické znázornění regulace Wnt signální dráhy. Upraveno dle [45]

Experimenty in vitro ukázaly, že FOXK2 může podporovat buněčnou proliferaci a co víc, že za jeho zvýšenou regulaci je zodpovědný onkogen SOX9 tím, že se váže přímo na jeho promotor. Také bylo pozorováno spojení mezi expresí FOXK2 a expresí SOX9 v kolorektální rakovinové tkáni. Ze studie vyplývá, že transkripčně aktivovaný FOXK2 za pomoci SOX9 je zapojený do patogeneze kolorektální rakoviny a může do budoucna fungovat jako cíl při terapii [46].

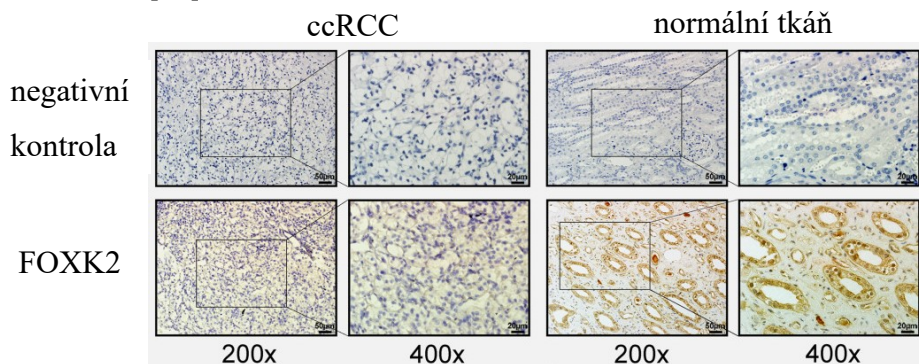
Nejen že FOXK2 působí jako onkogen u kolorektální rakoviny, ale i u rakoviny hepatocelulární (HCC). U tohoto typu rakoviny se zjistilo, že podporuje buněčnou proliferaci a migraci za pomoci PI3K/AKT signální dráhy. Aktivace této dráhy byla zachycena při nadměrné expresi FOXK2 a to mělo dále za následek zvýšenou expresi fosforylovaného AKT, survivinu, p27 atd. [47] FOXK2 bylo rozpoznáno jako přímý cíl pro miR-1271 touto a další studií [43]. Dohromady výsledky poukazují na regulaci FOXK2 pomocí miR-1271 a na podporu vývoje HCC pomocí PI3K/AKT signální dráhy, což představuje možný terapeutický cíl pro léčbu HCC [47].

1.7 Pohled na expresi FOXK2 u pacientů s rakovinou

Výzkumy zabývající se rolí FOXK2 u rakoviny patří mezi nedávné, a proto není k dispozici mnoho údajů [7]. Ve vzorcích pacientů s rakovinou prsu byla exprese FOXK2 analyzována imunohistochemicky a bylo zjištěno, že exprese jaderného FOXK2 vykazuje dominanci. Zároveň byl FOXK2 spojen s celkovou hladinou FOXO3a u pacientů, kteří obdrželi

chemoterapii a jeho exprese prokázala souvislost se stádiem nádoru. Také byl u těchto pacientů pozorován horší klinický výsledek. Při analýze přežití bylo poukázáno na významnou roli FOXK2 při vývoji rakoviny prsu a lékové rezistenci. Výsledky jsou v souladu s těmi získanými při pozorování nadměrné exprese FOXK2 v buňkách s lékovou rezistencí *in vitro*, které podávají informaci o spojitosti vysoké hladiny exprese jaderného FOXK2 s lékovou rezistencí a horším klinickým výsledkem [37]. Tato studie spolu s jednou další navíc popsala, pomocí chí-kvadrátových testů, vztah mezi expresí FOXK2 a ER α [36,37], který ale třetí studie nepotvrzuje [39]. Při porovnání tkáně odebrané pacientům s karcinomem prsu a tkáně okolní bylo objeveno, že ve vzorcích rakovinové tkáně byla snížena exprese, která je spjata s horšími prognózami [39]. Příčinou odlišností u některých výsledků v těchto studiích může být využití různých protilátek FOXK2, které se odlišují specifitou a schopností rozpoznat jiné formy FOXK2, či různými skupinami testovaných pacientů [7].

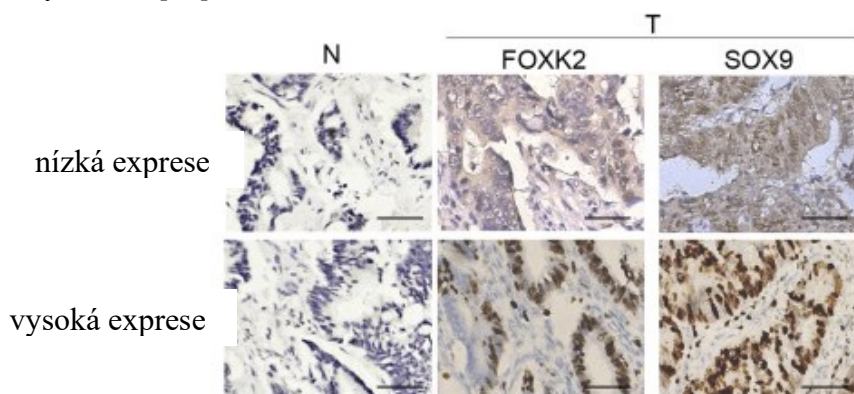
Bylo pozorováno, že hladina mRNA FOXK2 byla výrazně nižší u vysokostupňových gliomů, u nízkostupňových tomu bylo naopak. Analýza poukázala na negativní souvislost FOXK2 s nádorovým stupněm a indikátorem Ki67 a u pacientů s vyšší expresí FOXK2 byla zaznamenána delší míra přežití [42]. Kolektivem Liu, který se zaměřil na rakovinu žaludku, byla zjištěna pozitivní souvislost exprese FOXK2 s diferenciací nádoru a jeho zvýšená exprese se zlepšením v prognóze [41]. Podobné výsledky byly získány u vzorků pacientů s nemalobuněčnou rakovinou plic (NSCLC), kdy došlo ke snížení hladiny FOXK2 v tkáních s NSCLC oproti těm okolním nenádorovým a při vyšší expresi byla zaznamenána vyšší míra přežití [43]. Stejná analýza proběhla i u buněk s ccRCC a okolních nenádorových, u kterých byla zkoumána exprese FOXK2 a u tkání s ccRCC byla výrazně potlačena a zároveň byla nalezena nižší hladina FOXK2 (obr. 9). Nízká exprese FOXK2 znamenala nižší míru přežití u pacientů s ccRCC [40].



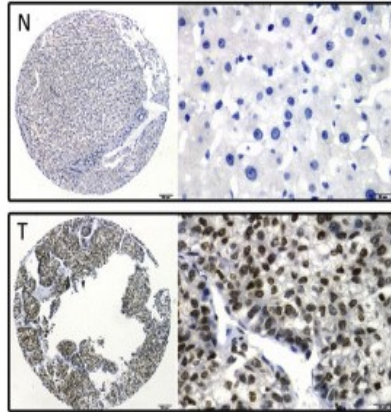
Obrázek 9 - Porovnání exprese FOXK2 za pomoci IHC u rakovinové tkáně (ccRCC) a tkáně zdravé s navíc provedenou negativní kontrolou. Upraveno dle [40]

Naopak studie Jia a spol. ukázala, že FOXX2 souvisí s pohlavím a nádorovým stadiem a jeho exprese s horší mírou přežití. Také jeho expresi popsala jako nezávislý prognostický faktor pro pacienty s ccRCC [48].

Na druhou stranu při srovnání kolorektální rakovinové (CRC) tkáně se zdravou tkání tlustého střeva bylo zjištěno, že je u tkáně s CRC zvýšená exprese FOXX2 a ta souvisí s jaderným DVL [45]. V jiné testované skupině byla pozorována interakce mezi SOX9 a FOXX2 u kolorektální rakovinové tkáně, kde byla exprese jak SOX9, tak FOXX2 zvýšena na rozdíl od tkáně nerakovinné (obr. 10). Při shrnutí získaných dat byla exprese FOXX2 a SOX9 spojena s malou mírou přežití u pacientů s tímto typem rakoviny [46]. U tkáně s hepatocelulární rakovinou bylo zjištěno, že obsahuje vysokou hladinu jak mRNA, tak proteinu FOXX2 v porovnání se zdravou jaterní tkání (obr. 11. str. 25). Exprese FOXX2 byla spojena s nádorovou velikostí, stadiem a vaskulární invazí a při jejím zvýšení i s nízkou mírou přežití. Ta byla následně propojena s miR-1271 mající roli jako tumor supresor u HCC. Podle TCGA bylo 21 % případů hepatocelulární rakoviny doprovázeno genovou amplifikací FOXX2 nebo zvýšenou regulací mRNA, zatímco u 25 % případů byla zaznamenán typický onkogen u tohoto typu rakoviny, MYC [47].



Obrázek 10 - Porovnání nízké a vysoké exprese FOXX2 a SOX9 u kolorektální rakovinové (T) a nerakovinné (N) tkáně. Upraveno dle [46]



Obrázek 11 - Porovnání exprese FOXC2 u hepatocelulární rakovinové (T) a nerakovinové (N) tkáně pomocí IHC barvení. Upraveno dle [47]

2. Cíle práce

1. Příprava DNA vazebné domény transkripčního faktoru FOXK2 rekombinantní expresí v buňkách *Escherichia coli*
2. Studium tvorby komplexu dvouvláknové DNA s DNA vazebnou doménou transkripčního faktoru FOXK2 metodami nativní hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením a nativní elektroforetické separace

3. Materiály

3.1. Chemikálie

acetonitril	Merck, Německo
agar	Oxford, USA
akrylamid (99,5 %)	Sigma-Aldrich, USA
bromfenolová modř (ACS kvalita)	Serva, Německo
coomassie Brilliant Blue R 250 (65%, ultrapure)	VWR International, USA
1,2-bis(dimethylamino)ethan (TEMED) (99,5%, GC)	Sigma-Aldrich, USA
1,4-dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, USA
dodecylsírán sodný (SDS)	Bio-Rad, USA
ethanol (HPLC kvalita, p. a. kvalita)	Lach-Ner, ČR
GelRed	Biotium, USA
glycerol	Lach-Ner, ČR
HEPES (99,5%)	Sigma-Aldrich, USA
hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
hydroxid sodný (p. a. kvalita)	Lach-Ner, ČR
chloramfenikol	Jarsey Lab Supply, USA
chlorid sodný (p. a. kvalita)	Lach-Ner, ČR
imidazol (p. a. kvalita)	Fluka, Švýcarsko
isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) (98%)	VWR International, USA
kanamycin	Sigma-Aldrich, USA
kyselina bicincholinová	Sigma-Aldrich, USA
kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	VWR International, USA
kyselina chlorovodíková (37%, ASC kvalita)	Sigma-Aldrich, USA
kyselina mravenčí	Fluka, Švýcarsko

kyselina octová (99,7%, ACS kvalita)	Fluka, Švýcarsko
kyselina trifluoroctová (99%)	Sigma-Aldrich, USA
methanol (LC-MS grade)	FischerScientific, USA
N,N-methylen-bis-akrylamid (99%)	Sigma-Aldrich, USA
peroxodisíran amonný	Sigma-Aldrich, USA
Prestained Protein MW Marker	ThermoScientific, USA
seeBlue™ Plus2 Pre-stainedProtein Standard	Invitrogen, USA
síran měďnatý (4%)	Sigma-Aldrich, USA
TEV proteasa	Sigma-Aldrich, USA
tris(hydroxymethyl)aminomethan (99,8%)	Bio-Rad, USA
voda (neionizovaná, LC-MS kvalita)	Merck, Německo
yeast extrakt (extrakt z kvasnic)	Oxoid, USA

3.2 Přístroje a laboratorní vybavení

analytické váhy AL54-IC	Mettler Toledo, Švýcarsko
automatické pipety	Gilson, USA
BioFrac Fraction Collector	Bio-Rad, USA
centrifuga 5920R s výměnnými rotory	Eppendorf, Německo
centrifugační koncentrátoary	Millipore, USA
centrifugační kyvety 11	Beckam Coulter, USA
centrifugační zkumavky (15 ml, 50 ml)	Corning, USA
fotodokumentační systém	Bio-Rad, USA
hmotnostní spektrometr solariX XR 15T	Bruker Daltonics, USA
chladnička s mrazničkou	Samsung, Jižní Korea
chromatografický systém NGC Quest 10	Bio-Rad, USA
inkubátor	BMT, ČR

kolona Bio-Scale Mini Nuvia (Ni-Charged)	Bio-Rad, USA
kolona ENrich SEC 70 10×300 mm	Bio-Rad, USA
kolona MicroTrap™ – proteinová	Michrom Bioresources, USA
ledovač Powericer XL	Klarstein, Německo
magnetická míchačka C-MAG HS10 digital	Ika, Německo
membránové filtry (0,45 µm)	Merck, Německo
mikrostríkačka (250 µl, 500 µl, 1000 µl)	Hamilton, USA
odsolovací kolony Zeba™ Micro Spin Desalting	ThermoScientific, Švédsko
pH elektroda InLab Expert Mettler	Toledo, Švýcarsko
pH metr Orion Star A111 Thermo	Scientific, USA
předvážky HF 1200G	AND, USA
pipetovací špičky pro nanášení na gel (0,5–20 µl)	Eppendorf, Německo
souprava pro SDS-PAGE	Bio-Rad, USA
spektrofotometr DeNovix DS-11 FX +	DeNovix, USA
stolní minicentrifuga minikin	Eppendorf, Německo
termostat s třepačkou Thermomixer komfort	Eppendorf, Německo
ultracentrifuga Avanti j-26 XP s výměnnými rotory	Beckman Coulter, USA
ultrazvuková sonda UP200S	Hielscher, Německo
ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex	Maneko, ČR
úhlový rotor JLA-9.1000	Beckman Coulter, USA
výkyvný rotor S-4× 1000	Eppendorf, Německo
vortex	Scientifica, Itálie
zdroj napětí Power Pac Universal	Bio-Rad, USA
zdroj napětí MP-250V Cleaver	Scientific, UK

3.3 Bakteriální kmeny

E. coli BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL Stratagene, USA

Genotyp: F⁻ *ompT* hsdS(rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tet^r *gal* λ(DE3)

endA Hte [*argU proL Cam^r*] [*argU ileY leuW* Strep/Spec^r]

3.4 Vektory a oligonukleotidy

pET-28a(+)-DBD FOXK2 Gene Universal, USA

DAF16 f (5'-GAACAAATGGGTT-3')

Sigma-Aldrich, USA

DAF16 r (5'-AACCCATTTGTTC-3')

Sigma-Aldrich, USA

3.5 Roztoky, pufry a média

Akrylamidová směs pro SDS-PAGE (30%)

29% (w/v) akrylamid, 1% (w/v) N,N-methylen-bisakrylamid

Barvicí roztok pro SDS-PAGE gely

45% (v/v) methanol, 10% (v/v) kyselina octová, 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant

Blue R-250

Dialyzační pufr

4 l, 20 mmol/l HEPES, 50 mmol/l NaCl, pH 8,0

Ekvilibrační pufr pro afinitní chromatografii

750 ml, 20 mmol/l HEPES, 500 mmol/l NaCl, 20 mmol/l imidazol, pH 7,5

Ekvilibrační pufr pro druhou afinitní chromatografii

500 ml, 20 mmol/l HEPES, 150 mmol/l NaCl, 20 mmol/l imidazol, pH 7,5

Eluční pufr pro afinitní chromatografii

250 ml, 20 mmol/l HEPES, 500 mmol/l NaCl, 50 mmol/l imidazol, pH 7,5

Eluční pufr pro druhou afinitní chromatografii

250 ml, 20 mmol/l HEPES, 150 mmol/l NaCl, 500 mmol/l imidazol, pH 7,5

LB médium

1% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) extrakt z kvasnic (yeast extrakt), 1% (w/v) NaCl, pH 7,4

LB médium s agarem

LB médium s 1,25% (w/v) agaru

Lyzační roztok

ekvilibrační pufr pro afinitní chromatografii, proteázové inhibitory

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE

55% (v/v) H₂O, 35% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kyselina octová

TBE pufr 10x koncentrovaný

0,89 mol/l Tris, 0,89 mol/l kyselina boritá, 0,02 mol/l EDTA, pH 8,3

Tris-Glycin SDS pufr

25mM Tris, 192mM glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3

Vzorkový pufr pro nativní gelovou elektroforézu

10 mmol/l Tris, 0,03% (w/v) bromfenolová modř, 60% (v/v) glycerol,

60 mmol/l EDTA, pH 7,6

Všechny pufrы použité při chromatografiích byly nejprve filtrovány a odvzdušněny.

4. Metody

4.1 Transformace kompetentních buněk a příprava noční kultury

Prvním krokem přípravy proteinu FOXK2 byla transformace kompetentních buněk metodou teplotního šoku. K transformaci byly použity buňky BL21 RIPL, které byly uchovávány v mrazáku při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a před samotnou transformací byly vloženy na led, aby rozmrzly. Tento úkon byl proveden i s plasmidem pET 28a(+). Mezitím byla připravena vodní lázeň, která je potřebná k tepelnému šoku. Po rozmrznutí buněk a plasmidu bylo k $40\text{ }\mu\text{l}$ buněk přidáno $0,4\text{ }\mu\text{l}$ plasmidu ($0,5\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Takto připravená směs byla ponechána se inkubovat na ledu a poté byla vložena do vodní lázně na 45 s při $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po vyjmutí z vodní lázně byl vzorek uložen zpět na led na dvě minuty. Ve sterilním prostředí bylo převedeno $40\text{ }\mu\text{l}$ vzorku do $360\text{ }\mu\text{l}$ sterilního LB média a roztok byl ponechán se inkubovat v třepačce na 1 hodinu při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 200 ot./min . Jako negativní kontrola sloužilo převedení $40\text{ }\mu\text{l}$ buněk bez plasmidu do $360\text{ }\mu\text{l}$ sterilního LB média. Vzorky byly nanесeny na agarové plotny s chloramfenikolem ($25\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$) a kanamycinem ($50\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$) a byly po ní rovnoměrně rozetřeny. Plotny byly ponechány přes noc při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ dnem vzhůru.

Následující den byly inokulovány tři kolonie buněk sterilním párátkem do 5 ml sterilního LB média obsahující kanamycin ($50\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$) a chloramfenikol ($25\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$) a byly ponechány na třepačce při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 200 ot./min přes noc.

4.2 Produkce DNA vazebné domény FOXK2 ve velkém objemu média

Do 2 l Erlenmeyerových lahví se záhyby s 1 l LB média, 1 ml chloramfenikolu ($25\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$) a kanamycinu ($50\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$) byly přidány 2 ml buněčné noční kultury a byly ponechány inkubovat se na třepačce při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 200 ot./min . Z lahví byl postupně odebírán 1 ml a byla měřena optická denzita při 600 nm (OD_{600}) na spektrofotometru DeNovix DS-11. Poté co dosáhla OD_{600} hodnoty $0,9$, bylo do lahví přidáno $500\text{ }\mu\text{l}$ 1 M IPTG a lahve byly ponechány přes noc na třepačce při $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 200 ot./min . Druhý den byly kultury centrifugovány na centrifuze Avanti v rotoru typu JLA-9.1000 po dobu 15 min na $7000\times g$ a při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl následně odstraněn, pelety byly resuspendovány v pufru obsahující 20 mM HEPES a 50 mM NaCl a vzniklý roztok byl centrifugován na stolní centrifuze při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $10\text{ }000\times g$ po dobu 15 minut . Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a pelety byly zamrazeny na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3 Purifikace

4.3.1 Izolace proteinů z buněčné kultury

Buňky byly rozmrazeny a resuspendovány ve 25 ml ekvilibračního pufru pro afinitní chromatografii a byly lyzovány pomocí ultrazvuku po dobu 2x5 minut s hodnotou amplitudy 70, přičemž celá práce probíhala na ledu. Lyzát byl centrifugován 45 minut při 40000× g a dále se pracovalo jen se supernatantem.

4.3.2 Afinitní chromatografie

Při afinitní chromatografii se pracovalo s kolonou s imobilizovanými nikelnatými ionty Bio-Scale Mini Nuvia (Bio-Rad), která by měla vázat protein a to díky afinitě histidinů k těmto iontům na N-konci proteinu. Nejprve byla kolona ekvilibrována příslušným ekvilibračním pufrem (vizte seznam roztoků). Poté byl na kolonu externí pumpou nanesen lyzát při průtoku 1 ml/min a následně byly proteiny zachycené na koloně eluovány příslušným elučním pufrem pomocí zvyšování gradientu imidazolu při průtoku 1 ml/min. Frakce byly sbírány po 0,5 ml a dle měřené absorbance při 280 nm a výsledku elektroforetické separace v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodné (SDS-PAGE) byly vybrány ty, se kterými se dále pracovalo.

4.3.3 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS

Analýza pomocí SDS elektroforézy byla využívána k vyhodnocení čistoty frakcí získaných u každé chromatografie. Z jednotlivých frakcí byly připraveny vzorky a to tak, že bylo 20 µl vzorku smícháno s 5 µl 5× koncentrovaného vzorkového pufru. Vzorky byly vždy zahřáty na 95 °C na 5 min a centrifugovány na stolní centrifuze 5 min při 10000× g. Vzorky byly nanášeny na polyakrylamidový gel složený z 5% zaostřovacího a 15% separačního gelu (Tab. 1). Nejprve byl připraven 15% separační gel, který byl nanesen mezi skla elektroforetické aparatury a byl převrstven vodou. Po polymerizaci, která trvala přibližně 30 minut, byl připraven 5% zaostřovací gel, kterým se převrstvil separační gel a do kterého byl vložen hřeben s 10 jamkami. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 200 V v Tris-Glycin SDS pufru. Gely byly barveny a následně odbarveny pomocí roztoků pro SDS-PAGE založené na barvení Coomassie Brilliant Blue. Ze získaných výsledků byly vybrány nejčistší frakce, se kterými se pracovalo dále.

Tabulka 1 – Objemy složek potřebných pro přípravu 15% separačního a 5% zaostřovacího gelu

složka	objemy složek (ml)	
	15% separační gel	5% zaostřovací gel
dH ₂ O	1,1	0,68 ml

složka	objemy složek (ml)	
	15% separační gel	15% separační gel
30% akrylamidová směs	2,5	0,17 ml
1,5M Tris (pH 8,8)	1,3	-
1M Tris (pH 6,8)	-	0,13
10% SDS	0,05	0,01
10% APS (peroxodisíran amonný)	0,05	0,01
TEMED	0,002	0,001

4.3.4 Štěpení histidinové kotvy

Zvolené frakce z afinitní chromatografie byly smíchány a byla k nim přidána TEV proteasa, která rozpoznává sekvenci ENLYFQG a štěpí mezi glutaminem a glycinem, v hmotnostním poměru 1:50. Roztok byl dialyzován za stálého míchání přes noc v chladové místnosti (8 °C). Při neúplném rozštěpení byla k roztoku přidávána opět TEV proteasa v hmotnostním poměru 1:50, dokud nedošlo k úplnému doštěpení.

4.3.5 Hmotnostně spektrometrická analýza produktů štěpení

Zjištění míry odštěpení histidinové kotvy bylo stanoveno hmotnostní spektrometrií s ESI ionizací. Vzorek byl nejdříve odsolen pomocí proteinové kolony MicroTap™. K tomu bylo nutné 20 µl vzorku vyředit 200 µl 0,1% roztokem kyseliny trifluoroctové (TFA) (v/v). Před samotným nanesením vzorku byla kolona ekvilibrována 0,1% roztokem TFA. Stejným roztokem byla kolona promyta i po nanesení vzorku a nakonec byl odsolený vzorek z kolony eluován roztokem 80% acetonitrilu s 0,1% TFA (v/v). Roztoky byly na kolonu nanášeny mikrostríkačkou. Získaný eluát byl vyředit roztokem 50% methanolu s 0,1% kyselinou mravenčí (v/v). Samotné měření bylo provedeno Mgr. Zdeňkem Kukačkou, Ph.D.

4.3.6 Druhá afinitní chromatografie

Po odštěpení histidinové kotvy z proteinu bylo přistoupeno k dalším purifikačním krokům. Tím následujícím byla druhá afinitní chromatografie, jež byla využita pro odstranění přebytečné TEV proteasy, která na rozdíl od FOXK2 obsahuje histidinovou kotvu na N-konci, tudíž byla opět využita kolona s imobilizovanými nikelnatými ionty. Kolona byla ekvilibrována příslušným ekvilibračním pufrem a následně na ni byl nanesen vzorek injekční stříkačkou. Jelikož protein neobsahuje již histidinovou kotvu, dochází k jeho eluci hned, zatímco TEV proteasa je z kolony eluována příslušným elučním pufrem a to gradientem imidazolu při průtoku 1 ml/min. Frakce zachycené během separace byly analyzovány pomocí SDS-PAGE dle

postupu popsaného v kapitole 4.3.3. na straně 33. Na základě jejích výsledků byly pro další práci vybrány ty frakce, které odpovídaly studovanému proteinu v co nejčistší kvalitě.

4.3.7 Gelová permeační chromatografie

Před provedením gelové permeační chromatografie byly vybrané frakce z druhé afinitní chromatografie zakoncentrovány pomocí koncentrátoru Amicon® Ultra 4mL (MWCO 3 kDa) na objem 1 ml. Při této chromatografii byla využita kolona ENrich Sec-70 10×300 mm (Bio-Rad), která byla ekvilibrována příslušným ekvilibračním pufrům při průtoku 1 ml/min. Vzorek byl aplikován pomocí injekční stříkačky a frakce byly sbírány po 1 ml. Frakce zachycené během gelové permeační chromatografie byly opět analyzovány pomocí SDS-PAGE. Na základě jejích výsledků byly pro další práci vybrány ty frakce, které odpovídaly studovanému proteinu v co nejčistší kvalitě.

4.4 Analýza DNA vazebné domény FOXK2 s dvouvláknovou DNA

4.4.1 Nativní elektroforéza

Oligonukleotid DAF16, jež byl vybrán pro studium vazby s proteinem na základě předešlého studia [14], byl zahřát v termostatu na 95 °C při 300 ot/min na 5 min. Po uplynutí této doby bylo vyčkáno na klesnutí teploty zpět na 25 °C. Byly připraveny vzorky se samotnou jednovláknovou DNA (ssDNA r/f), dvouvláknovou DNA (dsDNA, vznikla smísením jednovláknových) a proteinem. Zbylé vzorky byly směsí proteinu o různých koncentracích dvouvláknové DNA (1 μM, 3 μM, 5 μM, 10 μM, 20 μM, 40 μM). Protein byl 90 μM a byl přidáván ve stejném objemu. Na závěr byly ke vzorkům přidány 2 μl vzorkového pufru pro nativní elektroforézu a byly doplněny na 12 μl pufrům obsahujícím HEPES. Byl připraven polyakrylamidový gel (Tab. 2), do jehož jamek vytvořených hřebenem byly vzorky nanášeny. Elektroforéza byla provedena v ledové lázni za konstantního napětí 100 V a v přítomnosti 1× koncentrovaného TBE pufru. Po ukončení byl gel opláchnut v dH₂O a následně byl barven fluorescenčním barvivem GelRed po dobu 15 minut. Vizualizace byla provedena ve fotodokumentačním systému (Bio-Rad).

Tabulka 2 – Objemy složek potřebných k přípravě gelu pro nativní elektroforézu

složka	objem složky (ml)
dH ₂ O	5
30% akrylamidová směs	4
10× TBE (ph 8,3)	1
10% peroxidisíran amonný	0,08
TEMED	0,008

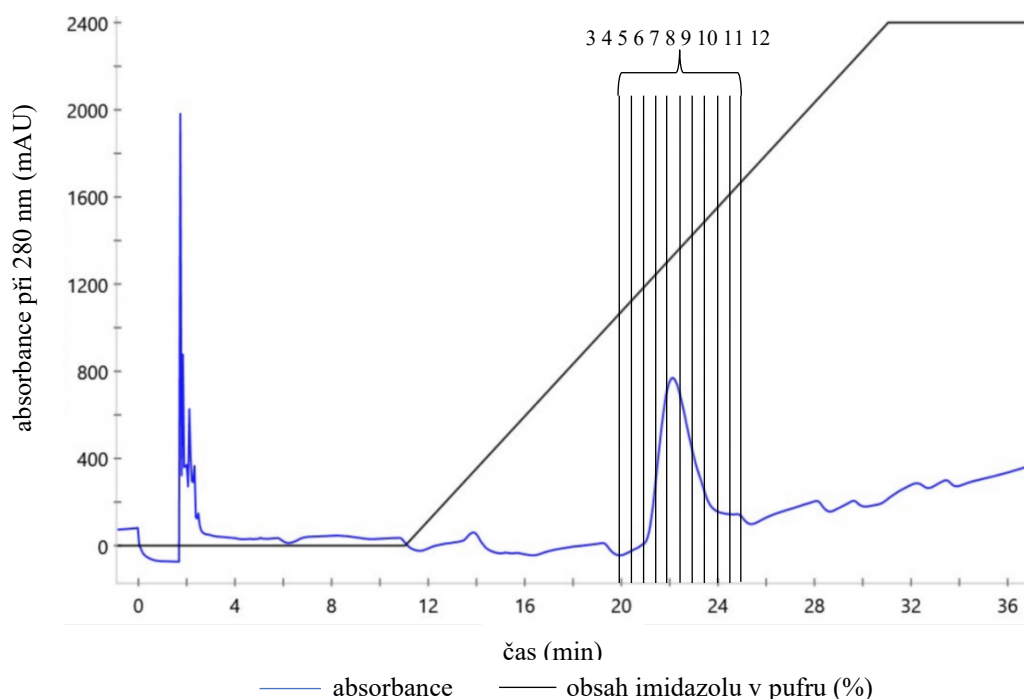
4.4.2 Nativní hmotnostní spektrometrie

Pro potřeby měření nativní spektrometrie bylo nutné nejprve protein převést do pufrčního systému s co nejnižším obsahem solí. K tomuto účelu bylo využito kolon Zeba Micro Spin (ThermoScientific) (MWCO 7 kDa, 75 μ l). Nejprve byly tři kolony Zeba Micro Spin převedeny do roztoku 150mM octanu amonného. Toho bylo docíleno opakovanou centrifugací 3x1 minuta při 1000 \times g, přičemž na každou kolonu bylo po každé nanášeno 50 μ l octanu amonného. Mezitím byl připraven 0,5mM oligonukleotid DAF16 (dsDNA), který byl nejprve zahřát na 95 $^{\circ}$ C na pět minut při 300 ot/min a poté ponechán zchladnout na laboratorní teplotu. Po ekvilibraci octanem amonným bylo na jednu kolonu nanášeno 12 μ l proteinu, zatímco do dalších dvou 3 μ l oligonukleotidu a byly centrifugovány 2 minuty na 1000 \times g. U získaného proteinu bylo potřeba zjistit koncentraci, čehož bylo docíleno bicincholinovou metodou (BCA). Bylo připraveno BCA činidlo smícháním 4% roztoku síranu měďnatého (w/v) a bicincholinové kyseliny v poměru 1:50 a následně bylo 80 μ l činidla přidáno ke 4 μ l vzorku nebo standardu hovězího sérového albuminu. Takto připravené směsi byly ponechány inkubovat 30 minut při 37 $^{\circ}$ C v termostatu a poté byla změřena absorbance při 560 nm pomocí spektrofotometru DeNovix DS-11 FX+. Nejdříve byly změřeny standardy o různých koncentracích (0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1,0 mg/ml) a z těchto hodnot byla sestavena kalibrační křivka. Z kalibrační křivky byla stanovena koncentrace proteinu, která činila 0,07 mg/ml (6 μ M). Pomocí spektrofotometru DeNovix DS-11 FX+ byla zjištěna koncentrace také dsDNA, která činila 300 μ M, a zředěním 300 μ M dsDNA se 150mM octanem amonným byla získána 6 μ M dsDNA. Protein o známé koncentraci byl analyzován pomocí nativní hmotnostní spektrometrie. Následně bylo smícháno 5 μ l 6 μ M proteinu s 5 μ l 6 μ M dsDNA. Analýzou tohoto roztoku byla zkoumána přítomnost komplexu.

5. Výsledky

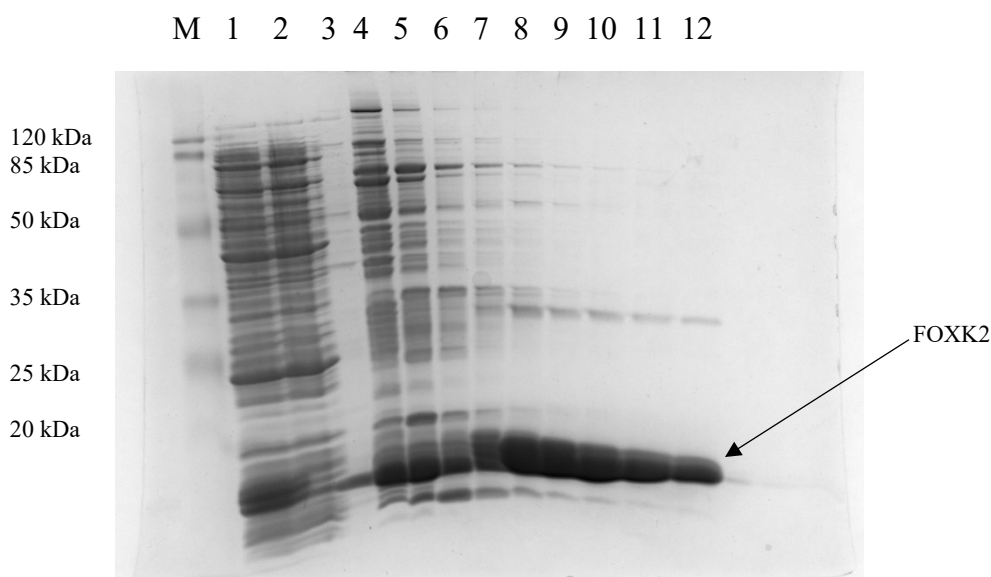
5.1 Afinity chromatografie

Exprimovaný protein FOXK2 byl purifikován sérií chromatografických kroků. Tím úvodním, který měl za cíl zachytit protein pomocí histidinové kotvy a tak ho oddělit od dalších proteinů v buněčném lyzátu, byla afinity chromatografie. Její záznam (obr. 12) zobrazuje naměřenou absorbanci při 280 nm a jsou v něm patrná 2 eluční maxima. První které pravděpodobně odpovídá proteinům z buněčného lyzátu a poté maximum odpovídající DBD FOXK2.



Obrázek 12 – Záznam z afinity chromatografie s vyznačenými frakcemi 3-12 – modrá křivka - absorbance při 280 nm, černá křivka - zvyšující se obsah imidazolu v pufru (20mM-0,5M)

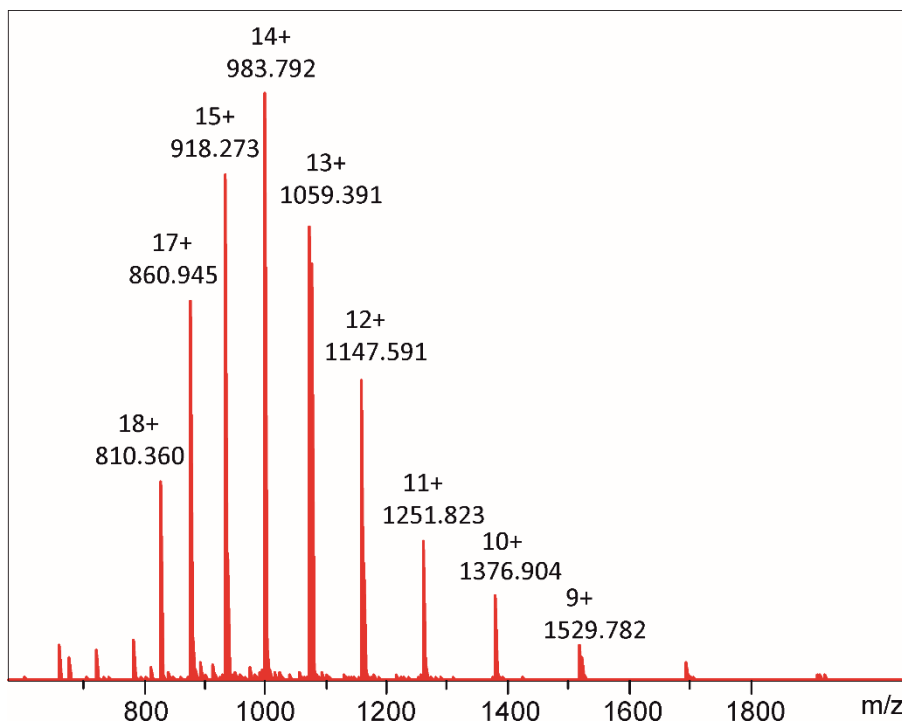
Ze získaných frakcí byla provedena SDS elektroforéza, přičemž na obr. 13 (str. 38) je zobrazen z ní získaný gel. Lze z něj vyčíst, že DBD FOXK2, jehož molekulová hmotnost odpovídá 13,9 kDa, se úspěšně zachytil na koloně a odpovídá druhému elučnímu maximum v chromatogramu (obr. 12). Z gelu lze také pozorovat, že nejčistšími frakcemi byly frakce 10-12, které byly použity pro další práci.



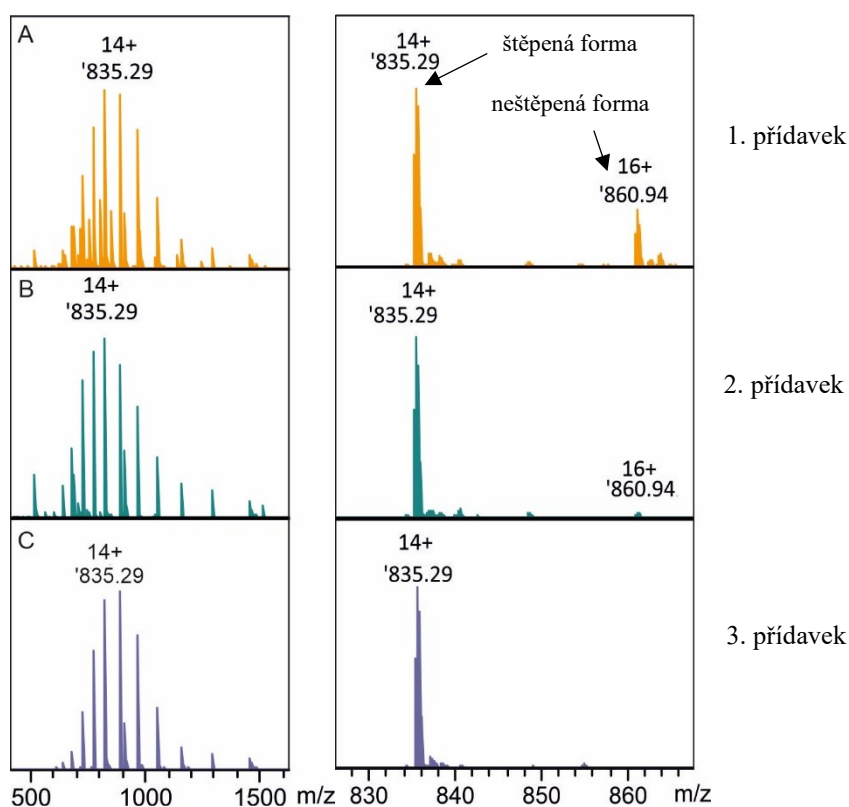
Obrázek 13 – Polyakrylamidový gel z provedené SDS elektroforézy – M – marker; 1 - vzorek před provedením afinitní chromatografie; 2 - vzorek po zachycení na kolonu; 3-12 – sbírané frakce

5.2 Štěpení histidinové kotvy na N-konci

Po první afinitní chromatografii byly vybrané frakce smíchány a byla provedena jejich analýza pomocí hmotnostního spektrometru s ESI ionizací. Na naměřeném spektru je k vidění DBD FOXK2 v neštěpené formě. Majoritním píkem spektra je nábojový stav 16+ (obr. 14, str. 39). Experimentálně zjištěná monoizotopická hodnota ($M+H^+$) m/z u vzorku činila 13 759,993 Da, což se liší od teoretické hodnoty DBD FOXK2 (13 759,974 Da) o 1,4 ppm. Lze tedy s vysokou mírou pravděpodobnosti předpokládat, že získaným proteinem je skutečně DBD FOXK2. K smíchaným frakcím byla přidána TEV proteasa za současné dialýzy v dialyzačním pufru. První přídavek TEV proteasy byl v poměru 1:50 a v naměřených spektrech (obr. 15A, str. 39) je stále vidět izotopová obálka odpovídající nepoštěpenému proteinu. Proto byl k proteinu dodán druhý přídavek TEV proteasy v poměru 1:50. Následující den byl pozorován úbytek nepoštěpené formy DBD FOXK2 (obr. 15B, str. 39) nicméně byla tato forma stále přítomna, a proto byla ke vzorku přidána třetí dávka proteasy v poměru 1:50. Po tomto přídavku již nebylo pozorováno žádné zastoupení nepoštěpené formy proteinu (obr. 15C, str. 39), nicméně bylo zjištěno, že v průběhu štěpení došlo k částečné degradaci proteinu, jelikož naměřená hodnota m/z odpovídá proteinu, u něhož na C-konci došlo k odštěpení 3 aminokyselin (RPR).



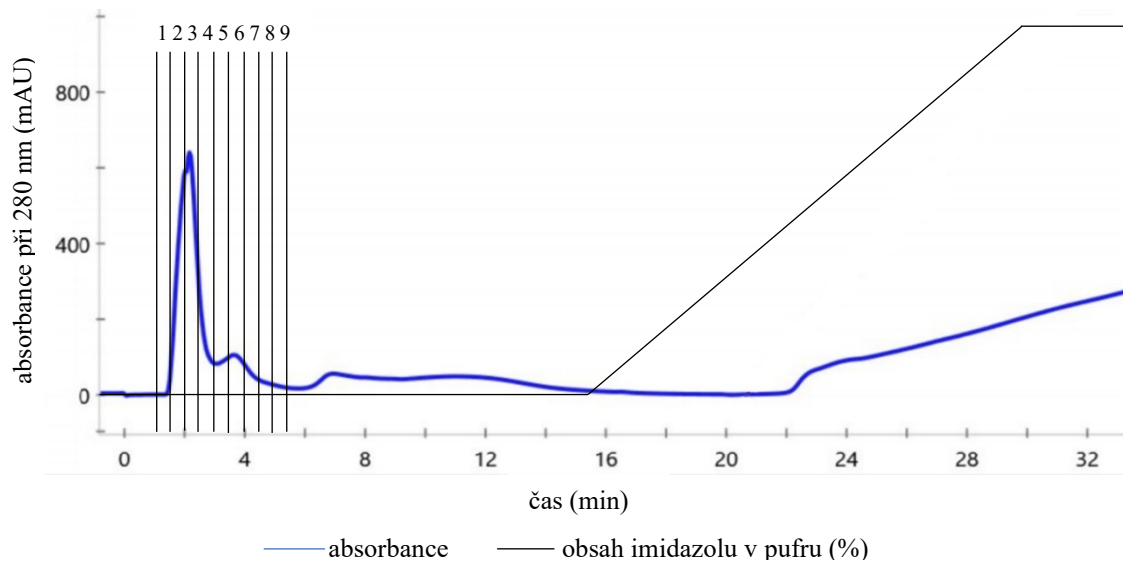
Obrázek 14 – Hmotnostní spektrum směsné frakce po afinitní chromatografii, izotopový profil odpovídá DBD FOXK2 v neštěpené formě



Obrázek 15 – Spektra z hmotnostního spektrometru s ESI ionizací zobrazující průběh štěpení histidinové kotvy na N-konci – vlevo celé spektrum a vpravo přibližné spektrum – A – spektra po prvním přidavku TEV proteasy, B – spektra po druhém přidavku TEV proteasy, C – spektra po třetím přidavku TEV proteasy

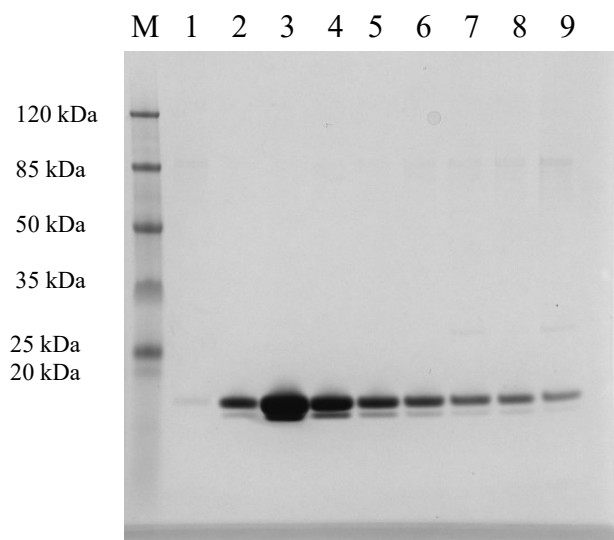
5.3 Druhá afinitní chromatografie

Dalším purifikačním krokem byla druhá afinitní chromatografie, jejímž cílem bylo odstranění TEV proteasy, která se na rozdíl od studovaného proteinu na afinitní koloně zachycuje. Z druhé afinitní chromatografie byl získán chromatogram, na kterém je k vidění naměřená absorbance při 280 nm i s jediným elučním maximem, které odpovídá frakci nezachycené na koloně (obr. 16), což by naznačovalo, že se může jednat o DBD FOXK2.



Obrázek 16 – Chromatogram získaný při druhé afinitní chromatografii s vyznačenými frakcemi 1-9 – modrá křivka - absorbance při 280 nm, černá křivka - zvyšující se obsah imidazolu v pufru (20mM-0,5M)

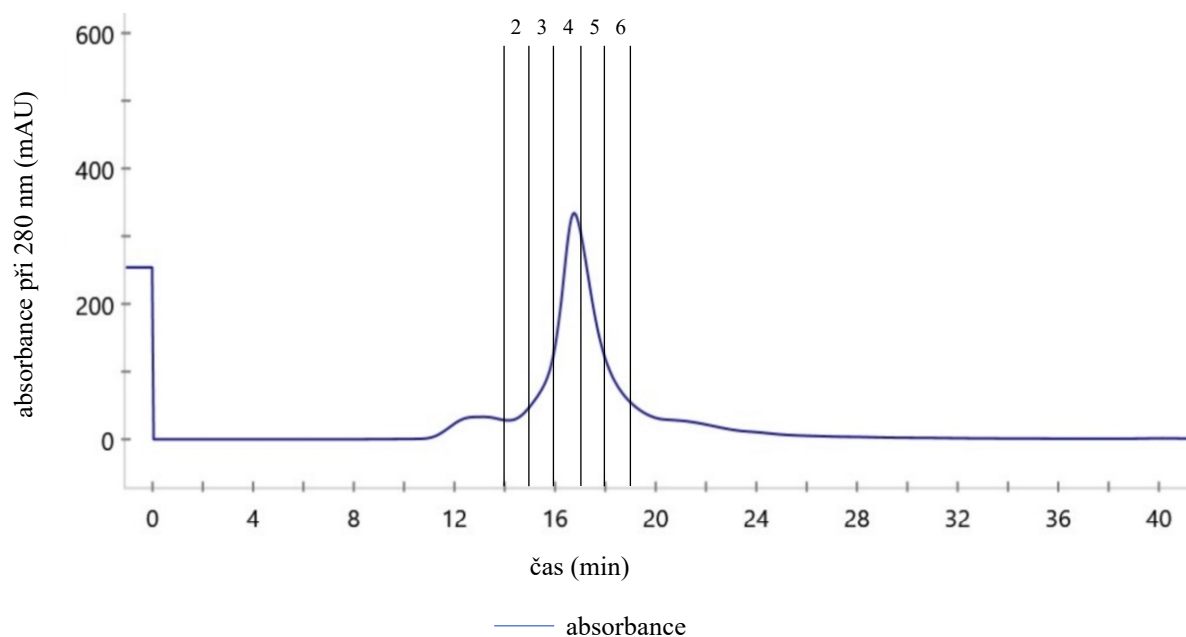
Ze získaných frakcí byla provedena SDS elektroforéza (obr. 17, str. 41). Z gelu lze vyčíst, že získané frakce DBD FOXK2 obsahovaly, jelikož pozorujeme silný pruh odpovídající hmotnosti proteinu. Nicméně u některých frakcí jsou patrné pruhy dva, což může být vznikem další formy tohoto proteinu. Pro další studium byly vybrány frakce 3 a 4.



Obrázek 17 – Polyakrylamidový gel po provedení SDS elektroforézy po druhé afinitní chromatografii – M – proteinový marker; 1-9 - sbírané frakce

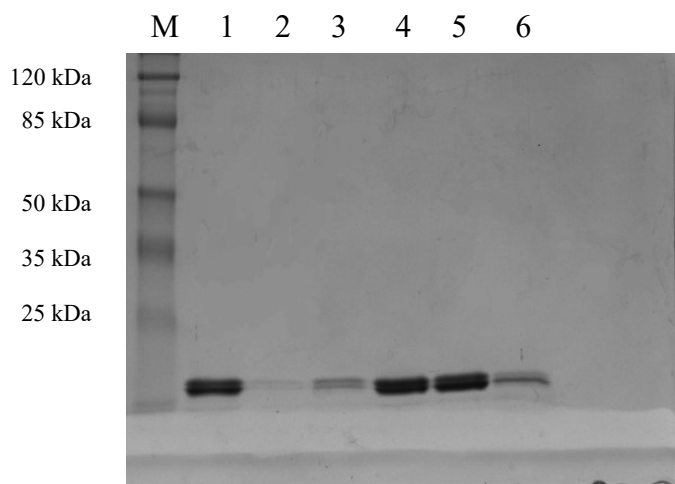
5.4 Gelová permeační chromatografie

Posledním purifikačním krokem bylo provedení gelové permeační chromatografie, jejíž záznam zobrazující absorbanci naměřenou při 280 nm s píkem odpovídajícím DBD FOXK2 se nalézá na obrázku 18.



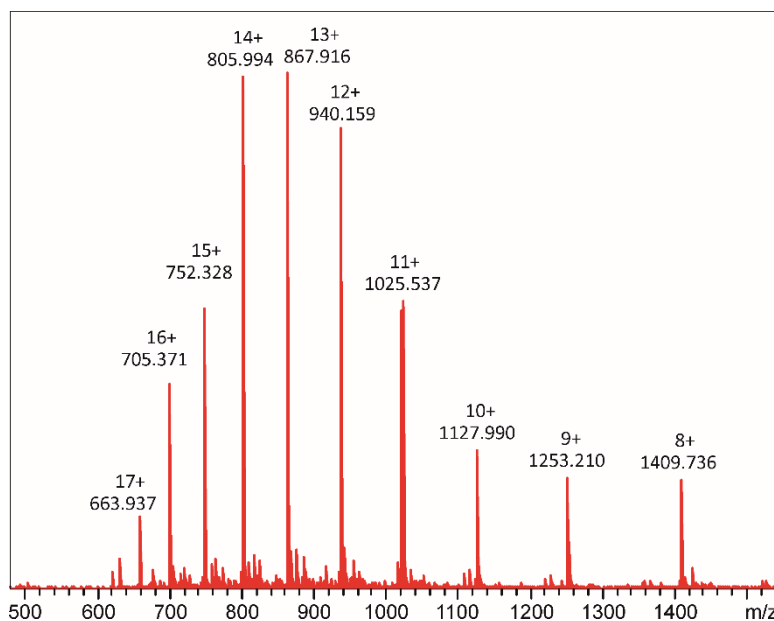
Obrázek 18 – Chromatogram z gelové permeační chromatografie s vyznačenými frakcemi 2-6 – modrá křivka - absorbance při 280 nm

Z frakcí byla provedena SDS elektroforéza (obr. 19, str. 42). Na gelu lze pozorovat silný pruh, jehož molekulová hmotnost odpovídá DBD FOXK2. I v tomto případě je na gelu vidět více forem tohoto proteinu.



Obrázek 19 – Polyakrylamidový gel frakcí z gelové permeační chromatografie – M – proteinový marker; 1 - vzorek před gelovou permeační chromatografií; 2 – 6 - sbírané frakce

Za nečistší frakce byly vybrány frakce 4 a 5, které byly smíchány a vzorek byl analyzován na hmotnostním spektrometru (obr. 20). Na naměřeném spektru je možné vidět izotopový profil DBD FOXK2 po dokončení všech purifikačních kroků. Experimentálně zjištěná monoizotopická hodnota ($M+H^+$) m/z u vzorku činila 11 270,820 Da, což se liší od teoretické hodnoty o 3 aminokyseliny (RPR) z C-konce kratší DBD FOXK2 (11 270,827 Da) o 0,6 ppm.

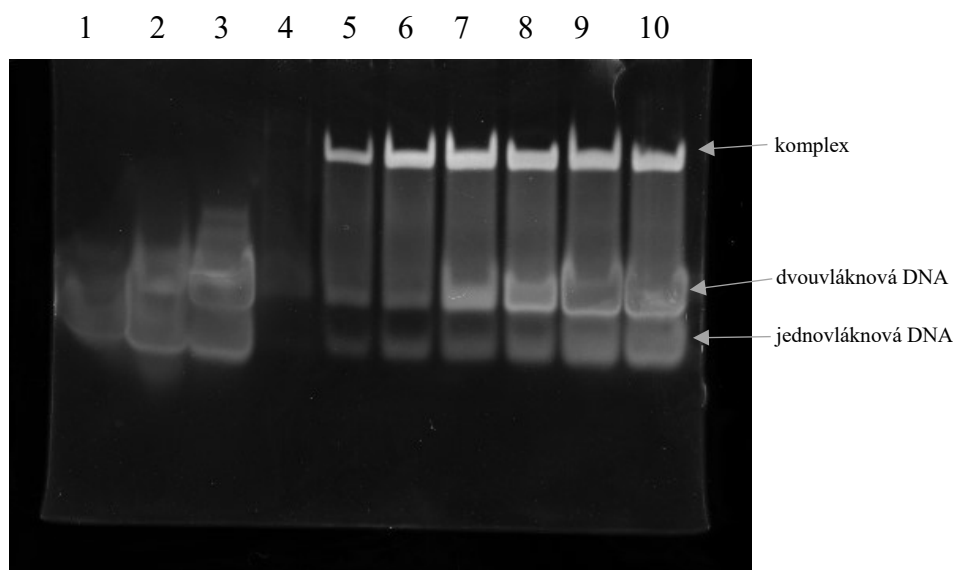


Obrázek 20 – Spektrum z hmotnostního spektrometru zobrazující DBD FOXK2 o 3 aminokyseliny kratší s nábojovým číslem 13+

5.5 Nativní elektroforéza

Ke studiu interakce proteinu s oligonukleotidem DAF16 byla využita nativní elektroforéza (vizte kapitola 4.4.1, str. 35), ze které byl získán gel (obr. 21, str. 43). Na gelu lze pozorovat jak samostatné DNA (dráhy 1-3), tak vznikající komplex již při nízkých koncentracích dsDNA (dráhy 5-6), přičemž se zvyšující se koncentrací dsDNA je pruh odpovídající komplexu

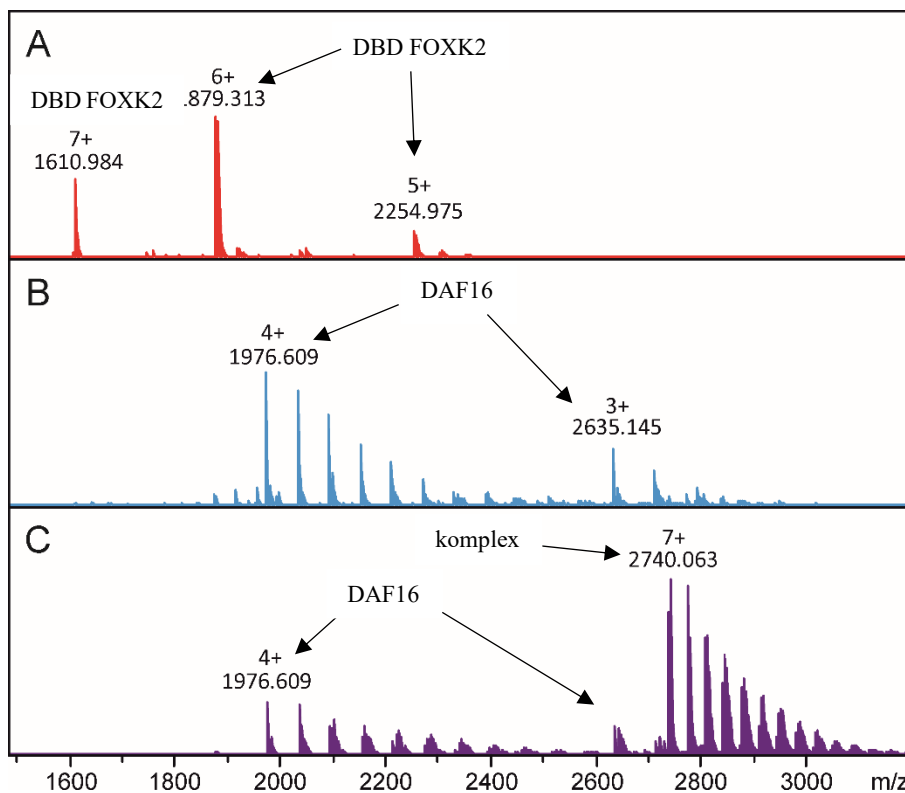
výraznější a to až do doby, kdy koncentrace dsDNA převýšila koncentraci proteinu. Dále už je vidět, že pruh odpovídající komplexu nenarůstá a naopak narůstá pruh odpovídající dsDNA.



Obrázek 21 – Polyakrylamidový gel z nativní elektroforézy – 1 – ssDNA r; 2 – ssDNA f; 3 – dsDNA; 4 – protein; 5 – 1 μM dsDNA + 9 μM protein; 6 – 3 μM dsDNA + 9 μM protein; 7 – 5 μM dsDNA + 9 μM protein; 8 – 10 μM dsDNA + 9 μM protein; 9 – 20 μM dsDNA + 9 μM protein; 10 – 40 μM dsDNA + 9 μM protein

5.6 Nativní hmotnostní spektrometrie

Druhou technikou, kterou byla studována interakce DBD FOXK2 s oligonukleotidem DAF16 byla nativní hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením. Protein získaný po převedení do octanu amonného byl analyzován samostatně (obr. 22A, str. 44), kde pozorujeme několik nábojových stavů jednoho proteinu, která hodnotami m/z (11 270,841 Da) odpovídá nedenaturované formě DBD FOXK2 s majoritním nábojovým číslem 6+. Následně byl analyzován samotný oligonukleotid DAF16 (obr. 22B, str. 44). V tomto případě je patrný izotopový profil odpovídající především čtyřikrát nabitému oligonukleotidu s průměrnou hodnotou m/z 7 904,402 Da. Bohužel tento profil také naznačuje velké množství aduktů, které hmotou odpovídají molekule HEPES, který vzorek patrně stále obsahoval. Spektrum vzorku obsahující směs proteinu s dsDNA v poměru 1:1 (obr. 22C, str. 44) potvrzuje tvorbu komplexu s nábojovým číslem 7+ odpovídající molekulové hmotnosti m/z 19 180,402 Da, ale i v tomto případě je možné sledovat velké množství aduktů, které se na komplex váží.



Obrázek 22 – Spektra z nativní hmotnostní spektrometrie – A – protein DBD FOXK2, B - oligonukleotid DAF16, C - komplex DBD FOXK2 s oligonukleotidem DAF16

6. Diskuze

Jedním z úkolů této práce byla příprava DNA vazebné domény transkripčního faktoru FOXK2. Nejprve byla provedena jeho rekombinantní exprese v bakteriálních buňkách BL21-CodonPlus kmene RIPL pomocí plasmidu pET-28a(+). Dalším krokem byla produkce proteinu ve velkém objemu média následována sérií purifikačních kroků. Jelikož při první afinitní chromatografii na koloně s imobilizovanými nikelnatými ionty, kde by se měl protein DBD FOXK2 zachytit pomocí histidinové kotvy, bylo zaznamenáno výrazné eluční maximum, existoval předpoklad, že exprese byla úspěšná. To bylo posléze potvrzeno následnou analýzou elektroforetickou separací v polyakrylamidovém gelu a hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením zachycených frakcí, kde byl sledován pruh respektive izotopová obálka odpovídající molekulové hmotnosti studovaného proteinu (13 760 Da). Nicméně samotný proces přípravy proteinu by určitě mohl být lépe provedený a zasloužil by do budoucna optimalizaci postupu. Prostor by v tomto ohledu mohl směřovat jednak k samotné produkci buněk (délka, teplota) anebo k jejich rozbití a následnému resuspendování získaného proteinu. Dále bylo provedeno štěpení histidinové kotvy na N-konci proteinu TEV proteasou současně s dialýzou v chladové místnosti (8 °C), ale jelikož štěpení nebylo úplné, bylo nutné štěpení zopakovat ještě 2×. Po analýze vzorku pomocí hmotnostní spektrometrie po třetím štěpení bylo zjištěno, že došlo k degradaci proteinu, jelikož přišel o tři aminokyseliny na C-konci, což lze vysvětlit dlouhou dobou štěpení, která dohromady činila 4 dny. Po druhé afinitní a gelové permeační chromatografii bylo na polyakrylamidových gelech patrné, že frakce obsahovaly více forem proteinu, neboť došlo k již dříve zmíněné degradaci. Degradaci by možná šlo předejít zkrácením doby štěpení, ke které by mohla pomoci změna teploty, během které štěpení probíhalo. Dalšími purifikačními kroky byla druhá afinitní chromatografie, kde byl protein úspěšně zbaven TEV proteasy a gelová permeační chromatografie, která sloužila k dočištění a především převedení proteinu do pufru bez imidazolu. Jelikož byla vysoká čistota pozorována již po provedení SDS elektroforézy po druhé afinitní chromatografii, bylo by možné tento krok nahradit dialýzou. Konečný výtěžek proteinu byl odhadován na 2 mg. Je možné, že by výtěžek mohl být vyšší a to například změnou podmínek při dialýze a koncentrování, jelikož u těchto kroků docházelo k největším ztrátám způsobených precipitací proteinu. Mezi další ztráty lze uvažovat také nevyužití všech frakcí získaných během chromatografií. Nicméně to by mohlo být na úkor kvality získaného preparátu, jelikož byly k dalšímu postupu vybrány vždy jen ty nejčistší frakce.

Druhým úkolem této studie bylo analyzovat vazbu připravené DNA vazebné domény s oligonukleotidem DAF16, který byl vybrán na základě předešlých studií [14]. Vazba byla úspěšně ověřena jak pomocí nativní elektroforézy, tak pomocí nativní hmotnostní spektrometrie. Z výsledků nativní elektroforézy lze usuzovat, že se dsDNA vázala v poměru 1:1 s 9 μ M proteinem při koncentraci 3 μ M. Od této koncentrace se již pruh odpovídající komplexu nemění a se zvyšující se koncentrací dsDNA přibývá více její volné formy. Zároveň je možné, že byla vaznost ovlivněna nepřesností při přípravě studovaného vzorku, přičemž tato chyba mohla nastat při ředění proteinu, který byl aplikován ke vzorkům, měření jeho koncentrace či kontaminací oligonukleotidu. Rovněž u nativní hmotnostní spektrometrie bylo možné sledovat samostatnou dsDNA v případě, že byla namíchána ekvimolární směs protein-dsDNA. To bohužel nahrává stejnému závěru, jako u výsledků nativní elektroforézy. Nicméně v případě měření dsDNA a komplexu bylo pozorováno velké množství aduktů, které hmotnostně odpovídali molekulám HEPES. Tento trend však nebyl sledován ve spektrech samotného proteinu. To by naznačovalo, že oligonukleotid DAF16 nebyl před analýzou dostatečně kvalitně odsolen. Avšak tento fakt by neměl mít na tvorbu komplexu zásadní vliv. Mohl by ovšem naznačit, že při přípravě oligonukleotidu došlo k již zmíněné kontaminaci. Závěrem může být konstatováno, že DBD FOXK2 (obr. 23, str. 46) a DAF16 komplex vytváří a to i v případě o 3 aminokyseliny z C-konce zkrácené formy proteinu. Tato částečná degradace by na první pohled vazbu a její afinitu neměla ovlivňovat, protože je od vazebného místa vzdálena. Avšak FOXK2 vykazuje rozsáhlé překryvy ve vaznosti na genomové oblasti in vivo s dalšími zástupci FOX rodiny a to FOXO3 a FOXJ3. Jeden z poznatků popisuje, že je možné, aby se více proteinů (nejen 3 zmíněné) z rodiny FOX vázalo na stejné místo, což by vedlo k jeho částečnému obsazení. Preference ve vaznosti jsou zaměřeny na jaderný motiv 5'-GTAAACA-3' [14]. Toto tvrzení bylo potvrzeno využitím oligonukleotidu DAF16, který tuto sekvenci obsahuje. Stejná sekvence byla využita i u další publikace, která popisuje jako hlavní místo pro navázání DNA třetí helix (obr. 24, str. 46). Nicméně, se ukázalo, že dalšími částmi DBD FOXK2, které vaznost mohou ovlivňovat jsou smyčka mezi druhým a třetím helixem a posledních 6 aminokyselinových zbytků. Během dřívějšího studia byla pozorována snížená schopnost DBD FOXK2 vázat se na DNA, kdy v sekvenci chybělo právě posledních 6 aminokyselinových zbytků. K tomuto poznatku byl přidán další, jelikož bylo zjištěno, že C-konec pozměnil orientaci těchto aminokyselinových zbytků a došlo k jejich kontaktu s malým žlábkem DNA [49]. Tato tvrzení by mohla znamenat, že při vzniku komplexu DBD FOXK2 s DNA mohla být ovlivněna její vaznost, jelikož došlo k degradaci tří aminokyselinových zbytků z C-konce. Na druhou stranu ze studie není patrné, v jaké míře či

jestli vůbec nepřítomnost pouze tří může vaznost ovlivnit. V našem případě se DBD FOXK2 vázalo, z čehož lze minimálně usuzovat to, že nějaké ovlivnění nebylo na první pohled zřetelné.



Obrázek 23 – Struktura DBD FOXK2 z databáze trojrozměrných struktur proteinů – modře je zabarvený N-konec na prvním helixu, zeleně druhý helix, žlutě třetí helix a červeně čtvrtý helix s C-koncem (2C6Y)



Obrázek 24 – Struktura DBD FOXK2 navázaná na dvoušroubovici DNA z databáze trojrozměrných struktur proteinů (2C6Y) – modře je označený třetí helix navázaný na velký žlábek DNA

7. Závěr

1. Byla připravena DNA vazebná doména transkripčního faktoru FOXK2 rekombinantní expresí v buňkách *Escherichia coli*.
2. Byla ověřena tvorba komplexu dvouvláknové DNA s DNA vazebnou doménou transkripčního faktoru FOXK2 metodami nativní hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením a nativní elektroforetické separace

Seznam citované literatury

- [1] Watford, M.; Wu, G.: Protein. *Advances in nutrition*. **9**:5, 651–653 (2018).
- [2] Hoffman, J. R.; Falvo, M. J.: Protein - Which is Best? *Journal of sports science & medicine*. **3**:3, 118–130, (2004).
- [3] Latchman D. S.: Transcription factors: an overview. *International journal of experimental pathology*. **74**:5, 417–422, (1993).
- [4] Kaestner, K. H.; Knochel, W.; Martinez, D. E.: Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes & development*. **14**:2, 142–146, (2000).
- [5] Mazet, F.; Yu, J. K.; Liberles, D. A.; Holland, L. Z.; Shimeld, S. M.: Phylogenetic relationships of the Fox (Forkhead) gene family in the Bilateria. *Gene*. **316**, 79–89, (2003).
- [6] Golson, M. L.; Kaestner, K. H.: Fox transcription factors: from development to disease. *Development*. **143**:24, 4558–4570, (2006).
- [7] Nestal de Moraes, G.; Carneiro, L.; Maia, R. C.; Lam, E. W.; Sharrocks, A. D.: FOXK2 Transcription Factor and Its Emerging Roles in Cancer. *Cancers*. **11**:3, 393, (2019).
- [8] Almawi, A. W.; Matthews, L. A.; Guarné, A.: FHA domains: Phosphopeptide binding and beyond. *Progress in biophysics and molecular biology*. **127**, 105–110, (2017).
- [9] Katoh, M.; Katoh, M.: Identification and characterization of human FOXX1 gene in silico. *International journal of molecular medicine*. **14**:1, 127–132, (2004).
- [10] Li, C.; Lai, C. F.; Sigman, D. S.; Gaynor, R. B.: Cloning of a cellular factor, interleukin binding factor, that binds to NFAT-like motifs in the human immunodeficiency virus long terminal repeat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **88**:17, 7739–7743, (1991).
- [11] Nirula, A.; Moore, D. J.; Gaynor, R. B.: Constitutive binding of the transcription factor interleukin-2 (IL-2) enhancer binding factor to the IL-2 promoter. *The Journal of biological chemistry*. **272**:12, 7736–7745, (1997).
- [12] Hackmann, K.; Stadler, A.; Schallner, J.; Franke, K.; Gerlach, E. M.; Schrock, E.; Rump, A.; Fauth, C.; Tinschert, S.; Oexle, K.: Severe intellectual disability, West syndrome, Dandy-Walker malformation, and syndactyly in a patient with partial tetrasomy 17q25.3. *American journal of medical genetics. Part A*. **161**:12, 3144–3149, (2013).

- [13] Crujeiras, A. B.; Pissios, P.; Moreno-Navarrete, J. M.; Diaz-Lagares, A.; Sandoval, J.; Gomez, A.; Ricart, W.; Esteller, M.; Casanueva, F. F.; Fernandez-Real, J. M.: An Epigenetic Signature in Adipose Tissue Is Linked to Nicotinamide N-Methyltransferase Gene Expression. *Molecular nutrition & food research*, e1700933, (2018).
- [14] Chen, X.; Ji, Z.; Webber, A.; Sharrocks, A. D.: Genome-wide binding studies reveal DNA binding specificity mechanisms and functional interplay amongst Forkhead transcription factors. *Nucleic acids research*. **44**:4, 1566–1578, (2016).
- [15] Ji, Z.; Donaldson, I. J.; Liu, J.; Hayes, A.; Zeef, L. A.; Sharrocks, A. D.: The forkhead transcription factor FOXK2 promotes AP-1-mediated transcriptional regulation. *Molecular and cellular biology*. **32**:2, 385–398, (2012).
- [16] Hess, J.; Angel, P.; Schorpp-Kistner, M.: AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *Journal of cell science*. **117**:25, 5965–5973, (2004).
- [17] Ji, Z.; Mohammed, H.; Webber, A.; Ridsdale, J.; Han, N.; Carroll, J. S.; Sharrocks, A. D.: The forkhead transcription factor FOXK2 acts as a chromatin targeting factor for the BAP1-containing histone deubiquitinase complex. *Nucleic acids research*. **42**:10, 6232–6242, (2014).
- [18] Carbone, M.; Yang, H.; Pass, H. I.; Krausz, T.; Testa, J. R.; Gaudino, G.: BAP1 and cancer. *Nature reviews. Cancer*. **13**:3, 153–159, (2013).
- [19] Okino, Y.; Machida, Y.; Frankland-Searby, S.; Machida, Y. J.: BRCA1-associated protein 1 (BAP1) deubiquitinase antagonizes the ubiquitin-mediated activation of FoxK2 target genes. *The Journal of biological chemistry*. **290**:3, 1580–1591, (2015).
- [20] Bowman, C. J.; Ayer, D. E.; Dynlacht, B. D.: Foxk proteins repress the initiation of starvation-induced atrophy and autophagy programs. *Nature cell biology*. **16**:12, 1202–1214, (2014). <https://doi.org/10.1038/ncb3062>
- [21] He, L.; Gomes, A. P.; Wang, X.; Yoon, S. O.; Lee, G.; Nagiec, M. J.; Cho, S.; Chavez, A.; Islam, T.; Yu, Y.; Asara, J. M.; Kim, B. Y.; Blenis, J.: mTORC1 Promotes Metabolic Reprogramming by the Suppression of GSK3-Dependent Foxk1 Phosphorylation. *Molecular cell*. **70**:5, 949–960, (2018).
- [22] Sukonina, V.; Ma, H.; Zhang, W.; Bartesaghi, S.; Subhash, S.; Heglind, M.; Foyn, H.; Betz, M. J.; Nilsson, D.; Lidell, M. E.; Naumann, J.; Haufs-Brusberg, S.; Palmgren, H.; Mondal,

T.; Beg, M.; Jedrychowski, M. P.; Taskén, K.; Pfeifer, A.; Peng, X. R.; Kanduri, C.; Enerbäck, S.: FOXK1 and FOXK2 regulate aerobic glycolysis. *Nature*. **566**:7743, 279–283, (2019).

[23] Spruijt, C. G.; Gnerlich, F.; Smits, A. H.; Pfaffeneder, T.; Jansen, P. W.; Bauer, C.; Münzel, M.; Wagner, M.; Müller, M.; Khan, F.; Eberl, H. C.; Mensinga, A.; Brinkman, A. B.; Lephikov, K.; Müller, U.; Walter, J.; Boelens, R.; van Ingen, H.; Leonhardt, H.; Carell, T.; Vermeulen, M.: Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell*. **152**:5, 1146–1159, (2013).

[24] Iurlaro, M.; Ficiz, G.; Oxley, D.; Raiber, E. A.; Bachman, M.; Booth, M. J.; Andrews, S.; Balasubramanian, S.; Reik, W.: A screen for hydroxymethylcytosine and formylcytosine binding proteins suggests functions in transcription and chromatin regulation. *Genome biology*. **14**:10, R119, (2013).

[25] Du, Q.; Luu, P. L.; Stirzaker, C.; Clark, S. J.: Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome. *Epigenomics*. **7**:6, 1051–1073, (2015).

[26] Baymaz, H. I.; Fournier, A.; Laget, S.; Ji, Z.; Jansen, P. W.; Smits, A. H.; Ferry, L.; Mensinga, A.; Poser, I.; Sharrocks, A.; Defossez, P. A.; Vermeulen, M.: MBD5 and MBD6 interact with the human PR-DUB complex through their methyl-CpG-binding domain. *Proteomics*. **14**:19, 2179–2189, (2014).

[27] Fujii, Y.; Nakamura, M.: FOXK2 transcription factor is a novel G/T-mismatch DNA binding protein. *Journal of biochemistry*. **147**:5, 705–709, (2010).

[28] Yu, H.; Pak, H.; Hammond-Martel, I.; Ghram, M.; Rodrigue, A.; Daou, S.; Barbour, H.; Corbeil, L.; Hébert, J.; Drobetsky, E.; Masson, J. Y.; Di Noia, J. M.; Affar, E. B.: Tumor suppressor and deubiquitinase BAP1 promotes DNA double-strand break repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **111**:1, 285–290, (2014).

[29] Zhu, G.; Spellman, P. T.; Volpe, T.; Brown, P. O.; Botstein, D.; Davis, T. N.; Futcher, B.: Two yeast forkhead genes regulate the cell cycle and pseudohyphal growth. *Nature*. **406**:6791, 90–94, (2000).

[30] Pic-Taylor, A.; Darieva, Z.; Morgan, B. A.; Sharrocks, A. D.: Regulation of cell cycle-specific gene expression through cyclin-dependent kinase-mediated phosphorylation of the forkhead transcription factor Fkh2p. *Molecular and cellular biology*. **24**:22, 10036–10046, (2004).

- [31] Darieva, Z.; Bulmer, R.; Pic-Taylor, A.; Doris, K. S.; Geymonat, M.; Sedgwick, S. G.; Morgan, B. A.; Sharrocks, A. D.: Polo kinase controls cell-cycle-dependent transcription by targeting a coactivator protein. *Nature*. **444**:7118, 494–498, (2006).
- [32] Marais, A.; Ji, Z.; Child, E. S.; Krause, E.; Mann, D. J.; Sharrocks, A. D.: Cell cycle-dependent regulation of the forkhead transcription factor FOXK2 by CDK·cyclin complexes. *The Journal of biological chemistry*. **285**:46, 35728–35739, (2010).
- [33] Petrie, M. A.; Kimball, A. L.; McHenry, C. L.; Suneja, M.; Yen, C. L.; Sharma, A.; Shields, R. K.: Distinct Skeletal Muscle Gene Regulation from Active Contraction, Passive Vibration, and Whole Body Heat Stress in Humans. *PloS one*. **11**:8, e0160594, (2016).
- [34] Komorek, J.; Kuppuswamy, M.; Subramanian, T.; Vijayalingam, S.; Lomonosova, E.; Zhao, L. J.; Mymryk, J. S.; Schmitt, K.; Chinnadurai, G.: Adenovirus type 5 E1A and E6 proteins of low-risk cutaneous beta-human papillomaviruses suppress cell transformation through interaction with FOXK1/K2 transcription factors. *Journal of virology*. **84**:6, 2719–2731, (2010).
- [35] van der Heide, L. P.; Wijchers, P. J.; von Oerthel, L.; Burbach, J. P.; Hoekman, M. F.; Smidt, M. P.: FoxK2 is required for cellular proliferation and survival. *Journal of cellular physiology*. **230**:5, 1013–1023, (2015).
- [36] Liu, Y.; Ao, X.; Jia, Z.; Bai, X. Y.; Xu, Z.; Hu, G.; Jiang, X.; Chen, M.; Wu, H.: FOXK2 transcription factor suppresses ER α -positive breast cancer cell growth through down-regulating the stability of ER α via mechanism involving BRCA1/BARD1. *Scientific reports*. **5**, 8796, (2015).
- [37] Nestal de Moraes, G.; Khongkow, P.; Gong, C.; Yao, S.; Gomes, A. R.; Ji, Z.; Kandola, N.; Delbue, D.; Man, E. P.; Khoo, U. S.; Sharrocks, A. D.; Lam, E. W.: Forkhead box K2 modulates epirubicin and paclitaxel sensitivity through FOXO3a in breast cancer. *Oncogenesis*. **4**:9, 167, (2015).
- [38] Nestal de Moraes, G.; Ji, Z.; Fan, L. Y.; Yao, S.; Zona, S.; Sharrocks, A. D.; Lam, E. W.: SUMOylation modulates FOXK2-mediated paclitaxel sensitivity in breast cancer cells. *Oncogenesis*. **7**:3, 29, (2018).
- [39] Shan, L.; Zhou, X.; Liu, X.; Wang, Y.; Su, D.; Hou, Y.; Yu, N.; Yang, C.; Liu, B.; Gao, J.; Duan, Y.; Yang, J.; Li, W.; Liang, J.; Sun, L.; Chen, K.; Xuan, C.; Shi, L.; Wang, Y.; Shang,

Y.: FOXK2 Elicits Massive Transcription Repression and Suppresses the Hypoxic Response and Breast Cancer Carcinogenesis. *Cancer cell*. **30**:5, 708–722, (2016).

[40] Zhang, F.; Ma, X.; Li, H.; Zhang, Y.; Li, X.; Chen, L.; Guo, G.; Gao, Y.; Gu, L.; Xie, Y.; Duan, J.; Zhang, X.: FOXK2 suppresses the malignant phenotype and induces apoptosis through inhibition of EGFR in clear-cell renal cell carcinoma. *International journal of cancer*. **142**:12, 2543–2557, (2018).

[41] Liu, X.; Wei, X.; Niu, W.; Wang, D.; Wang, B.; Zhuang, H.: Downregulation of FOXK2 is associated with poor prognosis in patients with gastric cancer. *Molecular medicine reports*. **18**:5, 4356–4364, (2018).

[42] Wang, B.; Zhang, X.; Wang, W.; Zhu, Z.; Tang, F.; Wang, D.; Liu, X.; Zhuang, H.; Yan, X.: Forkhead box K2 inhibits the proliferation, migration, and invasion of human glioma cells and predicts a favorable prognosis. *OncoTargets and therapy*. **11**, 1067–1075, (2018).

[43] Chen, S.; Jiang, S.; Hu, F.; Xu, Y.; Wang, T.; Mei, Q.: Foxk2 inhibits non-small cell lung cancer epithelial-mesenchymal transition and proliferation through the repression of different key target genes. *Oncology reports*. **37**:4, 2335–2347, (2017).

[44] Park, S. L.; Patel, Y. M.; Loo, L.; Mullen, D. J.; Offringa, I. A.; Maunakea, A.; Stram, D. O.; Siegmund, K.; Murphy, S. E.; Tiirikainen, M.; Le Marchand, L.: Association of internal smoking dose with blood DNA methylation in three racial/ethnic populations. *Clinical epigenetics*. **10**:1, 110, (2018).

[45] Wang, W.; Li, X.; Lee, M.; Jun, S.; Aziz, K. E.; Feng, L.; Tran, M. K.; Li, N.; McCrea, P. D.; Park, J. I.; Chen, J.: FOXKs promote Wnt/ β -catenin signaling by translocating DVL into the nucleus. *Developmental cell*. **32**:6, 707–718, (2015).

[46] Qian, Y.; Xia, S.; Feng, Z.: Sox9 mediated transcriptional activation of FOXK2 is critical for colorectal cancer cells proliferation. *Biochemical and biophysical research communications*. **483**:1, 475–481, (2017).

[47] Lin, M. F.; Yang, Y. F.; Peng, Z. P.; Zhang, M. F.; Liang, J. Y.; Chen, W.; Liu, X. H.; Zheng, Y. L.: FOXK2, regulated by miR-1271-5p, promotes cell growth and indicates unfavorable prognosis in hepatocellular carcinoma. *The international journal of biochemistry & cell biology*. **88**, 155–161, (2017).

[48] Jia, Z.; Wan, F.; Zhu, Y.; Shi, G.; Zhang, H.; Dai, B.; Ye, D.: Forkhead-box series expression network is associated with outcome of clear-cell renal cell carcinoma. *Oncology letters*. **15**:6, 8669–8680, (2018).

[49] 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. *The Journal of biological chemistry*. **281**:25, 17400–17409, (2006).