

UNIVERZITA KARLOVA  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra biochemie**

Studijní program: Biochemie  
Studijní obor: Biochemie



Bc. Adéla Hofmanová

**Modulace DNA vazebné afinity transkripčních faktorů FOXO a p53 prostřednictvím  
protein-proteinových interakcí**

Modulation of DNA Binding Affinity of Transcription Factors FOXO and p53 Through  
Protein-protein Interactions

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

Praha 2022

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

V Praze dne 18.5. 2022

Podpis:

## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. za podnětné rady a odborné vedení při práci na mém diplomovém projektu. Děkuji také svým kolegům M.Sc. Raju Mandalovi a Mgr. Kláře Kohoutové za jejich ochotu a pomoc při práci v laboratoři. Nemalé díky patří též mé konzultantce Veronice Obšilové, Ph.D. a celému kolektivu Laboratoře biofyzikální chemie a Oddělení proteinových struktur Fyziologického ústavu AV ČR v.v.i. za cenné rady a vytvoření příjemného pracovního prostředí. Na závěr bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za podporu během celého studia.

## Abstrakt

Podtřída „O“ transkripčních faktorů forkhead box (FOXO) představuje skupinu proteinů, které hrají zásadní roli v celé řadě buněčných procesů souvisejících se stresem, glukoneogenezí, kontrolou buněčného cyklu, apoptózou, senescencí a opravami poškozené DNA. Obecně jsou považovány za supresory nádorů. Ukázalo se však, že mohou naopak podporovat tumorigenezi a vyvolávat rezistenci na použítá chemoterapeutika. Navzdory mnoholetému výzkumu biologické role FOXO proteinů zůstává stále celá řada otázek, které je třeba zodpovědět. Je například otázkou, zda se nepatrné strukturní rozdíly pozorované v jinak vysoce homologních DNA-vazebných doménách jednotlivých zástupců FOXO promítají do jejich schopnosti vázat DNA. Není zcela jasné ani to, jak vazbu na DNA ovlivňují protein-proteinové interakce s vazebnými partnery. Nedávno byla popsána interakce FOXO transkripčních faktorů s proteinem p53, který bývá nazýván strážcem genomu kvůli zprostředkovávání reakce na akutní poškození DNA. Zdá se, že by vzájemná interakce proteinů FOXO a p53 mohla mít zásadní vliv na DNA vazebnou afinitu obou těchto proteinů. Na základě toho byly v rámci této práce exprimovány a purifikovány DNA-vazebné domény lidských transkripčních faktorů FOXO1, FOXO3 a FOXO4 (FOXO1<sub>(144-270)</sub>, FOXO3<sub>(142-267)</sub> a FOXO4<sub>(86-211)</sub>) a transaktivační doména proteinu p53 (p53<sub>(1-93)</sub>), která s FOXO-DBD interaguje. Následně byly s těmito proteiny provedeny vazebné studie pomocí měření stacionární anisotropie fluorescence, což vedlo ke stanovení DNA-vazebných afinit FOXO-DBD ke dvěma konsenzuálním sekvencím (IRE a DBE). Výsledky ukázaly, že všechny připravené FOXO-DBD vázaly sekvenci DBE s vyšší afinitou než sekvenci IRE, avšak mezi jednotlivými FOXO-DBD nebyly pozorovány výrazné rozdíly ve vazebné afinitě. Dále bylo pozorováno mírné snížení DNA-vazebné afinity FOXO1-DBD, ale ne FOXO3-DBD a FOXO4-DBD, k sekvenci IRE v přítomnosti p53-TAD.

**Klíčová slova:** FOXO, forkhead, p53, transkripční faktor, protein-protein interakce

## Abstract

The forkhead box "O" (FOXO) proteins are a subclass of the Forkhead family of transcription factors that play a critical role in a variety of cellular processes such as response to cellular stress, gluconeogenesis, cell cycle control, apoptosis, senescence, and repair of DNA damage. They are generally considered to be tumor suppressors. However, it has been shown that they can promote tumorigenesis and induce resistance to the chemotherapeutic agents. Despite many years of research into the biological role of FOXO proteins, a number of questions remain to be answered. For example, whether the slight structural differences observed in the otherwise highly homologous DNA-binding domains of individual FOXO transcription factors affect their DNA binding affinity. Furthermore, it is unclear how protein-protein interactions affect DNA binding affinity of FOXO proteins. Recent study has described the interaction of FOXO transcription factors with the p53 protein. Protein p53 is called the guardian of the genome due to its ability to mediate the response to acute DNA damage. The interaction of FOXO and p53 proteins appears to have a major effect on the DNA binding affinity of both these proteins. Based on this, DNA-binding domains of the human transcription factors FOXO1, FOXO3 and FOXO4 (FOXO1<sub>(144-270)</sub>, FOXO3<sub>(142-267)</sub> and FOXO4<sub>(86-211)</sub>) and the transactivation domain of p53 protein (p53<sub>(1-93)</sub>), which interacts with FOXO-DBD, were expressed and purified. Subsequently, DNA-binding affinities of FOXO-DBD for two consensus sequences (IRE and DBE) were determined using steady-state fluorescence anisotropy measurements. The results showed that all prepared FOXO-DBDs bound the DBE sequence with higher affinity than the IRE sequence, but no significant differences in binding affinity were observed between the individual FOXO-DBDs. Furthermore, a slight decrease in the DNA-binding affinity of FOXO1-DBD, but not FOXO3-DBD and FOXO4-DBD, to the IRE sequence was observed in the presence of p53-TAD.

**Keywords:** FOXO, forkhead, p53, transcription factor, protein-protein interaction

[IN CZECH]

# Obsah

Poděkování .....	3
Abstrakt .....	4
Abstract .....	5
Seznam použitých zkratek.....	9
1. Úvod.....	11
2. Literární přehled.....	12
2.1. Transkripce.....	12
2.2. Transkripční faktory.....	14
2.3. Transkripční faktor p53.....	15
2.4. Forkhead box transkripční faktory .....	16
2.5. Forkhead box O transkripční faktory .....	18
2.5.1. Transkripční faktor forkhead box O1.....	20
2.5.2. Transkripční faktor forkhead box O3.....	21
2.5.3. Transkripční faktor forkhead box O4.....	21
Interakce transkripčních faktorů forkhead box O4 a p53 .....	22
2.5.4. Transkripční faktor forkhead box O6.....	23
2.5.5. Regulace aktivity forkhead box O proteinů .....	24
Fosforylace.....	24
Acetylace.....	26
Ubikvitinace.....	26
2.5.6. Interakce forkhead box proteinů s DNA .....	27
3. Cíle práce .....	30
4. Materiál a přístroje .....	31
4.1. Použité chemikálie .....	31
4.2. Použité přístroje a pomůcky.....	32

5.	Použité metody a pracovní postupy .....	34
5.1.	Exprese proteinů a lýza buněk .....	34
5.1.1.	Transformace bakterií .....	34
5.1.2.	Exprese rekombinantních proteinů.....	35
5.1.3.	Sonikace .....	37
5.2.	Purifikace DNA-vazebných domén FOXO .....	38
5.2.1.	Niklová chelatační chromatografie .....	38
5.2.2.	Dialýza .....	39
5.2.3.	Heparinová afinitní chromatografie .....	40
5.2.4.	Gelová permeační chromatografie .....	41
5.3.	Purifikace transaktivací domény proteinu p53.....	43
5.3.1.	GST afinitní chromatografie .....	43
5.3.2.	Dialýza .....	44
5.3.3.	Aniontově výměnná chromatografie .....	44
5.3.4.	Gelová permeační chromatografie .....	46
5.3.5.	SDS-PAGE.....	47
5.4.	Měření stacionární anisotropie fluorescence.....	50
6.	Výsledky .....	56
6.1.	Purifikace proteinu FOXO1 <sub>(144-270)</sub> .....	56
6.1.1.	Niklová chelatační chromatografie .....	56
6.1.2.	Heparinová afinitní chromatografie .....	57
6.1.3.	Gelová permeační chromatografie .....	59
6.2.	Purifikace proteinu FOXO3 <sub>(142-267)</sub> .....	60
6.2.1.	Niklová chelatační chromatografie .....	60
6.2.2.	Heparinová afinitní chromatografie .....	61
6.2.3.	Gelová permeační chromatografie .....	63

6.3.	Purifikace proteinu FOXO4 <sub>(86-211)</sub> .....	64
6.3.1.	Niklová chelatační chromatografie .....	64
6.3.2.	Heparinová afinitní chromatografie .....	65
6.3.3.	Gelová permeační chromatografie .....	67
6.4.	Purifikace proteinu p53 <sub>(1-93)</sub> .....	68
6.4.1.	GST afinitní chromatografie .....	68
6.4.2.	Aniontově výměnná chromatografie .....	69
6.4.3.	Gelová permeační chromatografie .....	71
6.5.	Měření stacionární anisotropie fluorescence.....	72
6.5.1.	Měření DNA-vazebné afinity FOXO-DBD k sekvenci Flc-IRE .....	73
6.5.2.	Měření DNA-vazebné afinity FOXO-DBD k sekvenci Flc-DBE.....	75
7.	Diskuze .....	78
8.	Závěr .....	81
9.	Literární zdroje.....	82

## Seznam použitých zkratk

Akt/PKB	.....	protein kinasa B
ATP	.....	adenosintrifosfát
BI21 (DE3)	.....	kmen bakterií <i>E. coli</i> vhodný pro expresi proteinů
CBP	.....	CREB vázající protein (z angl. CREB binding protein)
DAF-16	.....	ortholog FOXO proteinů u <i>Caenorhabditis elegans</i>
DBD	.....	DNA-vazebná doména
DBE	.....	vazebný element rodiny DAF-16 (z angl. Daf-16 family member-binding element)
DNA	.....	deoxyribonukleová kyselina
DTT	.....	1,4-dithiothreitol
<i>E. coli</i>	.....	bakterie <i>Escherichia coli</i>
EDTA	.....	kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
FOX	.....	forkhead box transkripční faktory
FOXO	.....	„O“ podskupina forkhead box transkripčních faktorů
GST	.....	glutathion-S-transferasa
His-tag	.....	histidinová kotva
IPTG	.....	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid
IRE	.....	insulin responsivní element
IRS	.....	proteiny uplatňující se v insulinové kaskádě (z angl. insulin receptor substrate)
JNK	.....	Jun N-koncová kinasa
kbp	.....	kilobáze, tedy tisíc párů bází (z angl. kilobase pair)
LB medium	.....	médium pro bakterie dle Luria-Bertani (z angl. lysogeny broth)
MDM2	.....	ubikvitin ligasa FOX proteinů (z angl. mouse double minute 2)
MST1	.....	Ste-20 podobná kinasa 1
NES	.....	nukleární exportní sekvence
NLS	.....	nukleární lokalizační sekvence
NMR	.....	nukleární magnetická rezonance
PBS	.....	fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)
PKD1	.....	fosfoinositid-dependentní kinasa 1

PI3K .....	fosfatidylinositol-3-kinasa
RNA .....	ribonukleová kyselina
ROS .....	reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
SDS.....	dodecylsírán sodný (z angl. sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE.....	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (z angl. sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)
Ser.....	serin
SGK.....	sérum a glukokortikoid-regulovaná kinasa
SNP.....	jednonukleotidové polymorfismy (z angl. single nucleotide polymorphism)
TAD.....	transaktivační doména
TEMED .....	N, N, N', N'-tetraethylendiamin
TEV .....	proteasa viru tabákové mozaiky (z angl. Tobacco Etch Virus)
Thr .....	threonin
TRIS .....	tris(hydroxymethyl)aminomethan
U .....	jednotka (z angl. units)
v/v.....	objem/objem (z angl. volume/volume)
w/v.....	hmotnost/objem (z angl. weight/volume)

# 1. Úvod

Genová exprese je regulována na několika úrovních. Jedná se zejména o regulaci transkripční aktivity pomocí transkripčních faktorů, úpravy mRNA a posttranslační modifikace proteinů. Genová rodina forkhead box (FOX) kóduje evolučně konzervované proteiny, které ovlivňují transkripci celé řady genů, čímž se podílejí na regulaci buněčné homeostázy, proliferaci, vývoji organismu a stárnutí<sup>1</sup>.

Prvním objeveným genem z FOX rodiny byl gen *forkhead (fkh)* nalezený v *Drosophila melanogaster*<sup>2</sup>. Následoval objev *FOXA1* u krysy<sup>3</sup> a na základě srovnání těchto dvou genů byl charakterizován sdílený monomerní DNA-vazebný motiv tzv. forkhead doména, která je napříč všemi zástupci FOX rodiny vysoce konzervovaná<sup>4</sup>.

Postupem času bylo vyřešeno několik krystalových struktur jednotlivých zástupců z FOX rodiny a bylo nutné definovat nomenklaturu, dle níž budou FOX proteiny jednotně pojmenovány a rozřazeny<sup>5</sup>. Na základě fylogenetické analýzy forkhead domény bylo vytvořeno 15 podtříd, které byly časem rozšířeny o další 4 podtřídy. Aktuálně se tedy FOX proteiny dělí do 19 podtříd, které se značí „A“ až „S“.

Rodina FOX se skládá celkem ze 44 genů myšního genomu a z 50 genů lidského genomu, ke kterým se navíc řadí dva známé pseudogeny<sup>1</sup>. Hrají důležitou roli v regulaci metabolismu, imunitního systému a proliferace a jejich disfunkce je spojována s celou řadou lidských chorob včetně rakoviny. Tím se stávají potencionálními molekulárními biomarkery s využitím pro diagnostiku, prognózu a léčebné účely<sup>6</sup>. Je však zapotřebí dalšího výzkumu k identifikaci protein-proteinových interakcí, mechanismů účinku a posttranslačních modifikací.

Poměrně nedávno se navíc ukázalo, že jedním z interakčních partnerů FOXO transkripčních faktorů je protein p53, který má významnou roli v regulaci stárnutí, apoptózy a opravy poškozené DNA<sup>7</sup>. Aktivuje se především v reakci na různé typy buněčného stresu, čímž chrání buňky před tumorigenezí<sup>8</sup>. Gen kódující protein p53 je nejčastěji mutovaným genem lidské rakoviny, což z něj činí atraktivní cíl výzkumu. Navzdory intenzivnímu zkoumání však zůstává mnoho otázek nejasných. Mnoho z nich se týká i zmíněné interakce proteinu p53 s FOXO, která se zdá být naprosto klíčová pro regulaci senescence.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Transkripce

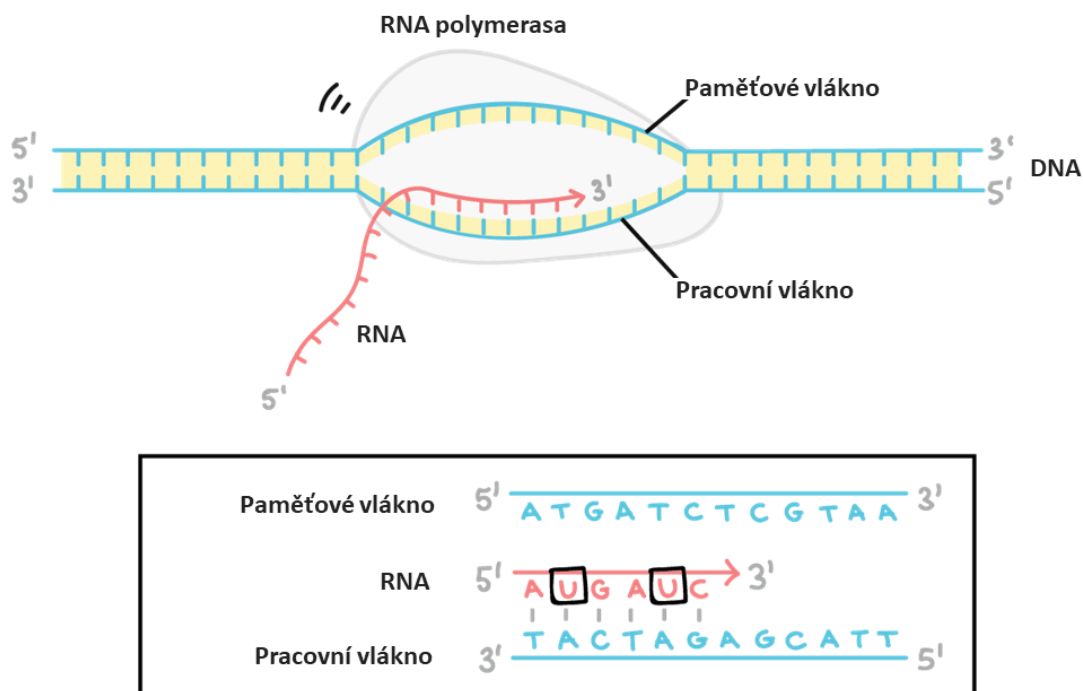
Transkripce je proces, při němž dochází k přepisu jednotlivých genů z DNA do RNA (Obr. 2.1, str. 13). K přepisu genetické informace dochází vždy pouze z jednoho tzv. pracovního vlákna DNA, které je využito jako předloha (templát). Druhé vlákno DNA bývá označováno jako paměťové a pro samotnou transkripci genu význam nemá. Nově vzniklé vlákno mRNA nazýváme primárním transkriptem a je vytvořeno dle principu komplementarity bází. Sekvence mRNA je totožná se sekvencí paměťového vlákna DNA s tím rozdílem, že v mRNA jsou všechny thyminové nukleotidy nahrazeny uracilovými.

Průběh transkripce je rozdělen do 3 fází. V první iniciační fázi dochází k nasednutí DNA-dependentní RNA polymerasy do oblasti promotoru, což je charakteristická sekvence DNA před začátkem genu. U prokaryot je promotor rozpoznán sigma faktorem RNA polymerasy, která se váže na konsenzuální sekvence v pozici -10 a -35 (10 a 35 nukleotidů před místem iniciace). Poté dojde k oddělení vláken DNA a vytvoření transkripční bubliny, čímž je transkripce zahájena. U eukaryot se RNA polymerasa nemůže sama o sobě vázat přímo na sekvenci promotoru, ale vyžaduje přítomnost obecných (bazálních) transkripčních faktorů, které jako první nasednou na promotorovou sekvenci za vzniku tzv. pre-iniciačního komplexu, který teprve umožní vazbu RNA polymerasy. Většina eukaryotických promotorů obsahuje sekvenci zvanou TATA box v pozici -25, která je, stejně jako konsenzuální sekvence -10 a -35 u prokaryot, bohatá na adenin a thymin, což usnadňuje oddělení vláken DNA.

Jakmile je RNA polymerasa navázaná v oblasti promotoru, může začít druhá elongační fáze, kdy se RNA polymerasa postupně posouvá po negativním vlákně DNA ve směru 3'-5' a katalyzuje připojování jednotlivých nukleotidů na 3'konec rostoucího vlákna RNA. U prokaryot najdeme jedinou RNA polymerasu, která syntetizuje všechny typy RNA (mRNA, rRNA, tRNA). Oproti tomu eukaryota využívají až 3 druhy RNA polymeras, které se liší jak svými chemickými vlastnostmi a strukturou, tak typem RNA, kterou syntetizují. Transkripci kódujících genů zajišťuje RNA polymerasa II. Zbylé dvě RNA polymerasy (I, III) syntetizují rRNA a tRNA.

Poslední fází je terminace, tedy ukončení transkripce. K té může dojít buď vlivem terminačních sekvencí, které umožní vytvoření stabilní vlásenky, jež způsobí zastavení transkripce a destabilizaci RNA polymerasy, nebo u prokaryot prostřednictvím Rho faktoru, který se váže na vnikající RNA a způsobuje oddělení transkriptu od RNA polymerasy.

Primární transkript je bezprostředně po svém vzniku podroben posttranskripčním a kotranskripčním úpravám, jako je připojení 7-methylguanosinové čepičky na 5'konec, polyadenylace 3'konce nebo také sestřih pre-mRNA (z ang. splicing). Sestřih je nejdůležitější posttranskripční úpravou eukaryot a dochází při něm k vyštěpení nekódujících sekvencí (intronů) a následnému spojení kódujících sekvencí (exonů) za vzniku funkční mRNA, jež je exportována z jádra a dále využita pro translaci. Oproti tomu u prokaryot žádné posttranskripční úpravy neprobíhají a primární transkripty jsou bezprostředně po transkripci připraveny k translaci. Ta je, kvůli absenci jaderné membrány, často realizována současně s transkripcí.



**Obr. 2.1 – Schéma probíhající transkripce (elongační fáze).** Šedě je znázorněna RNA polymerasa katalyzující připojování nukleotidů na 3'konec nově vznikajícího vlákna RNA, které je syntetizováno dle templátového (pracovního) vlákna DNA. Převzato a upraveno<sup>9</sup>.

## 2.2. Transkripční faktory

Transkripce a její regulace závisí na proteinech známých jako transkripční faktory. Jedná se o proteiny, které rozpoznávají a vážou regulační sekvence DNA, čímž ovlivňují míru genové exprese. Dělíme je na obecné (bazální) a specifické transkripční faktory.

Obecné transkripční faktory rozpoznávají promotorové sekvence mnoha genů a společně s RNA polymerasou se podílejí na tvorbě pre-iniciačního komplexu, který je nezbytný pro iniciaci transkripce. Specifické transkripční faktory nerozpoznávají promotor umístěný v blízkosti daného genu, ale cílí na sekvence specifických elementů, které mohou být od regulovaného genu vzdáleny stovky až tisíce párů bází. V závislosti na tom, zda vazbou transkripčních faktorů na specifické elementy dochází k zesílení či utlumení transkripce, se regulační sekvence dělí na zesilovače (z angl. enhancers) nebo tlumiče (z angl. silencers).

Transkripční faktory jsou zásadními regulátory genové exprese a mají rozhodující vliv na to, zda bude probíhat transkripce jejich cílových genů a v jakém rozsahu<sup>10</sup>. Proto musí být přísně regulovány, což je zajištěno na dvou principiálně odlišných úrovních. Buď se jedná o regulaci jejich koncentrace nebo aktivity. Koncentrace transkripčních faktorů může být regulována v jakémkoli kroku vedoucím od DNA k proteinu, zahrnující transkripci, posttranskripční úpravy RNA, transport RNA do cytoplasmy, degradaci RNA a také translaci. Jakmile je transkripční faktor syntetizován, přichází na řadu regulace jeho aktivity. Ta je modulována mnoha způsoby. Aby mohl ovlivňovat transkripci, musí být přenesen do jádra, což je zprostředkováno jadernou lokalizační sekvencí (NLS, z angl. nuclear localization signal). Ta může být maskována vazbou jiného proteinu nebo fosforylací tak, že je znemožněno přemístění faktoru do jádra. K ovlivnění transkripce je dále nezbytná schopnost faktoru vázat DNA (případně schopnost dimerizace či transaktivace), kterou lze ovlivnit posttranslační modifikací, vazbou ligandu či interakcí s vazebným partnerem.

Dle struktury DNA-vazebné domény, jež je zodpovědná za specifické rozpoznání cílové nukleotidové sekvence, se transkripční faktory dělí do jednotlivých rodin<sup>11</sup>. Mezi typické DNA-vazebné motivy patří leucinový zip, šroubovice-smyčka-šroubovice, šroubovice-otočka-šroubovice, homeobox, případně různé typy tzv. „zinkových prstů“ tedy zinek koordinující domény.

## 2.3. Transkripční faktor p53

Protein p53 je sekvenčně specifickým regulátorem transkripce<sup>12</sup>. V reakci na různé formy buněčného stresu ovlivňuje expresi celé řady cílových genů zapojených do buněčného metabolismu. Má vliv na kontrolu buněčného cyklu, opravu DNA, senescenci a také na apoptózu. Často bývá nazýván „strážcem genomu“ právě díky klíčové roli v reakci na poškození DNA. Narušení jeho funkce vede ke genomové nestabilitě a ke ztrátě kontroly nad průběhem buněčného cyklu.

Je kódovaný genem *TP53* (tumor protein p53) o velikosti 20 kbp, který je složen z 11 exonů a lokalizován na krátkém raménku chromozomu 17 (lokus 17p13.1)<sup>13</sup>. Mutace v tomto genu se vyskytují až u poloviny případů rakoviny u lidí. Většinou se jedná o jednonukleotidové tzv. missence mutace, které vedou ke vzniku defektního proteinu. Tyto mutace jsou široce distribuovány v celém genu, ale nejčastěji se nalézají v oblasti kódující DNA-vazebnou doménu proteinu<sup>14</sup>.

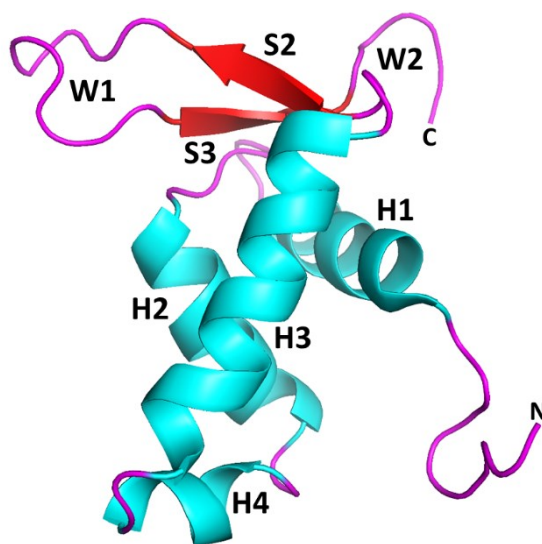
Co se týče struktury, je lidský protein p53 složen z 393 aminokyselinových zbytků a jeho aktivní formou je symetrický homotetramer<sup>15</sup>. Každý monomer se skládá z neuspořádané N-koncové transaktivační domény, oblasti bohaté na prolin, DNA-vazebné domény, jaderné lokalizační sekvence, oligomerizační domény a C-koncové domény. DNA-vazebná doména je zodpovědná za vazbu na specifické elementy DNA, které jsou umístěny v blízkosti promotorů cílových genů. Specifické elementy tvoří sekvence dvou dekamerních motivů v obecné podobě 5'-RRRCWWGYYY-3' (kde: R = A, G; W = A, T; Y = C, T), jež jsou od sebe odděleny sekvencí o délce 0-13 párů bází<sup>16</sup>. Na rozdíl od jiných transkripčních faktorů má p53, krom hlavní DNA-vazebné domény, ještě druhou doménu schopnou vázat DNA. Tou je C-koncová doména obsahující 9 bazických aminokyselinových zbytků. Ukázalo se však, že váže DNA nespecificky narozdíl od hlavní domény rozpoznávající zmíněnou konsenzuální sekvenci<sup>17</sup>.

Jeho transkripční aktivita je přísně regulována prostřednictvím celé řady posttranslačních modifikací a protein-proteinových interakcí. Mezi dobře prozkoumané posttranslační modifikace patří například fosforylace zbytků Ser/Thr, acetylace, ubikvitinace a sumoylace zbytků Lys<sup>18</sup>. Bylo popsáno, že posttranslační modifikace a interakce s jinými proteiny ovlivňují stabilitu proteinu i jeho schopnost vázat DNA<sup>19</sup>. Hlavním negativním regulátorem p53 je ubikvitin ligasa MDM2 (z angl. mouse double minute 2)<sup>13</sup>.

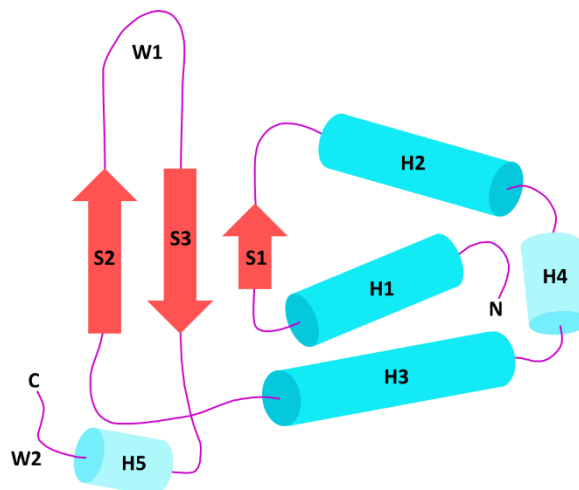
## 2.4. Forkhead box transkripční faktory

Transkripční faktory forkhead box (FOX) jsou rodinou evolučně konzervovaných proteinů, které byly identifikovány ve všech organismech napříč živočišnou říší (od kvasinek až po člověka)<sup>20</sup>. Jejich název je odvozen od genu *forkhead (fkh)*, který byl poprvé popsán v roce 1989 u modelového organismu *Drosophila melanogaster*, u něhož má mutace *fkh* za následek změnu tvaru přední části střeva na strukturu připomínající vidličku (angl. fork)<sup>2</sup>. Alternativně jsou tyto transkripční faktory na základě své struktury nazývány „proteiny s okřídlenou šroubovicí“ (z angl. winged helix proteins)<sup>21</sup>.

Všichni zástupci FOX rodiny sdílí charakteristickou vysoce konzervovanou DNA vazebnou doménu (DBD, z angl. DNA binding domain) zvanou forkhead doména (Obr. 2.2) (cit.<sup>22</sup>). Délka forkhead DBD je přibližně 110 aminokyselinových zbytků. Tvoří ji tři  $\alpha$ -helixy (H1-H3), tři  $\beta$ -vlákna (S1-S3) a dvě velké flexibilní smyčky, kterým se často přezdívá „křídla“ (W1 a W2). Elementy sekundární struktury jsou v rámci forkhead DBD uspořádány následovně: H1-S1-H2-H3-S2-W1-S3-W2 (Obr. 2.3, str. 17).



**Obr. 2.2 – Trojrozměrná struktura forkhead DBD proteinu FOXO4 z „O“ podskupiny (PDB ID: 1E17)<sup>23</sup>.** Forkhead doména lidského FOXO4<sub>(92-181)</sub> se skládá ze 3  $\alpha$ -helixů (H1-H3, modře), tří  $\beta$ -vláken (S1-S3, červeně) a dvou velkými flexibilními ohybů (W1 a W2, růžově). Je zobrazena jako stuhový model, který byl vytvořen v programu Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, verze 2.3.3 Schrödinger, LLC).



**Obr. 2.3 – Topologické schéma forkhead domény.** Modře jsou zobrazeny  $\alpha$ -helixy H1-H3, červeně  $\beta$ -vlákna S1-S3 a růžově flexibilní ohyby W1 a W2. Schéma zahrnuje i  $\alpha$ -helixy H4 a H5, které se vyskytují jen v některých forkhead doménách. Převzato a upraveno<sup>24</sup>.

FOX proteiny regulují mnoho biologických procesů jak během vývoje organismu, tak i v průběhu dospělosti<sup>25</sup>. Jejich případná disfunkce je spojena s celou řadou nemocí. V mnoha případech vede homozygotní delece jednoho z FOX genů k embryonální či perinatální letalitě. Krom toho dochází v důsledku mutace či deregulace FOX genů k vývojovým vadám a nemocem jako je rakovina<sup>26</sup>, Parkinsonova nemoc<sup>27</sup> nebo defekty imunitního systému<sup>28</sup>.

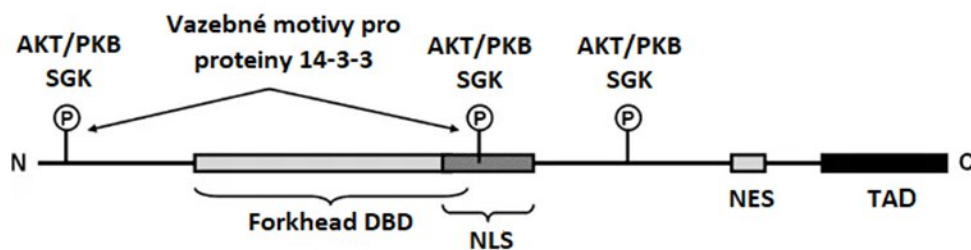
Rodina FOX transkripčních faktorů sestává z více jak 100 zástupců, kteří jsou dle sekvenční podobnosti jejich forkhead domén (a hlavně také oblastí mimo forkhead doménu) rozdělení do 19 podtříd (označovaných abecedně FOXA-FOXS)<sup>5,21</sup>. Jednotliví zástupci se dále v rámci podtřídy označují arabskými číslicemi. Do názvu FOX proteinů se také částečně promítá to, z jakého organismu daný protein pochází. U lidských proteinů název tvoří jen velká písmena (např. FOXO1). V názvu myších proteinů se píše velké jen počáteční písmeno (např. Foxo1) a u FOX proteinů, pocházejících z jiných živočišných druhů, se píše velké první a poslední písmeno (např. FoxO1).

V následujícím textu je, pro lepší přehlednost, názvosloví zjednodušeno tak, že jsou FOX proteiny pocházející z různých živočišných druhů (nevyjímaje člověka a myš) jednotně označovány velkými písmeny.

## 2.5. Forkhead box O transkripční faktory

Podtřída „O“ transkripčních faktorů FOX (FOXO) představuje skupinu intracelulárních proteinů, které jsou nezbytné pro celou řadu buněčných pochodů souvisejících se stresem, glukoneogenezí, kontrolou buněčného cyklu, apoptózou, senescencí a opravami DNA<sup>29</sup>. Tvoří ji 4 zástupci, a těmi jsou: FOXO1 (FKHR), FOXO3 (FKHRL1), FOXO4 (AFX) a FOXO6. Protein FOXO2 byl původně identifikován jako samostatný paralog, ale je homologní s FOXO3 a obdobně je FOXO5 (FOXO3B) exprimován pouze v *Danio rerio*<sup>30</sup>. FOXO jsou sekvenční homology obratlovců k transkripčnímu faktoru DAF-16, který byl nalezen v bezobratlém organismu *Caenorhabditis elegans*<sup>31</sup>, u něhož byla poprvé odhalena role těchto transkripčních faktorů na dlouhověkost. Účinek DAF-16 na dlouhověkost pravděpodobně souvisí s regulací genů, které jsou zapojeny do odpovědi proti oxidačnímu a tepelnému stresu<sup>32</sup>. U dalších modelových organismů byl pozorován vliv FOXO na délku života kmenových buněk a onemocnění související s věkem jako je rakovina nebo diabetes<sup>30</sup>.

Molekuly FOXO proteinů jsou složeny z následujících čtyř domén: vysoce konzervovaná forkhead DBD, jaderný lokalizační signál (NLS, z angl. nuclear localization signal), jaderný exportní signál (NES, z angl. nuclear export sequence) a transaktivační doména (TAD, z angl. transactivation domain) umístěná v C-koncové oblasti (Obr. 2.4) (cit<sup>24</sup>). Sekvence proteinů FOXO1, FOXO3 a FOXO6 mají podobnou délku, která činí přibližně 650 aminokyselinových zbytků. Jediný FOXO4 je o něco kratší a jeho sekvence dosahuje délky jen 500 aminokyselinových zbytků.



**Obr. 2.4 – Schématické zobrazení organizace jednotlivých domén FOXO proteinů.** Je zde znázorněna forkhead DBD, za níž bezprostředně následuje jaderná lokalizační sekvence (NLS), dále jaderná exportní sekvence (NES) a na C-koncovém segmentu transaktivační doména (TAD). Ve schématu jsou také symbolem P naznačena fosforylační místa pro příslušné kinasy, přičemž se fosforylací těchto míst vytváří dvě vazebná místa pro proteiny 14-3-3. Převzato a upraveno<sup>24</sup>.



Co se týče cílových oblastí DNA, všechny FOXO proteiny rozpoznávají dvě konsenzuální sekvence<sup>36</sup>. Jedna je známá jako vazebný element rodiny DAF-16 (DBE, z angl. Daf-16 family member-binding element)<sup>35</sup> o sekvenci 5'-GTAAA(T/C)AA-3' a druhá jako element reagující na inzulin (IRE, z angl. insulin response element)<sup>37</sup> o sekvenci 5'-(C/A)(A/C)AAA(C/T)AA-3'. Ačkoli jsou si obě sekvence velmi podobné, vážou FOXO proteiny DBE s vyšší afinitou<sup>38</sup>. Studie krystalových struktur FOXO1 ve vazbě na sekvence IRE i DBE odhalily rozdíly v tvorbě vodíkových můstků a vodou zprostředkovaných interakcí mezi forkhead DBD a oběma zmíněnými sekvencemi DNA, což je nejspíše příčinou snížené afinity k sekvenci IRE.

### 2.5.1. Transkripční faktor forkhead box O1

Prvním identifikovaným členem „O“ podskupiny FOX transkripčních faktorů byl FOXO1, původně označovaný jako FKHR (z angl. forkhead in rhabdomyosarcoma), neboť byl popsán v souvislosti s chromozomální translokací u lidských rhabdomyosarkomů<sup>39</sup>. Gen kódující FOXO1 se u lidí nachází na 13. chromozomu.

Protein FOXO1 má důležitou roli v metabolismu glukosy<sup>40</sup>. Je vysoce exprimován ve tkáních citlivých na inzulin, tedy v játrech, slinivce břišní, kosterním svalstvu a kostní i tukové tkáni. Ať už se jedná o stav sytosti, lačnění či inzulinové rezistence, zajišťuje udržení homeostázy energetického metabolismu. Během půstu FOXO1 indukuje glukoneogenezi v játrech. Současně podporuje přechod z oxidace sacharidů na oxidaci lipidů ve svalech tím, že reguluje expresi genů, které kódují třeba kinasu pyruvátdehydrogenasy a lipoprotein lipasu<sup>41</sup>. Ve stavu nasycení je transkripční aktivita jaterního a pankreatického FOXO1 inhibována inzulinem prostřednictvím aktivace inzulinové signální dráhy, kdy dochází k fosforylaci pomocí PKB/Akt, což vede k jadernému vyloučení FOXO1 a tím i k inhibici transkripce<sup>40</sup>.

Ukázalo se, že odstranění jedné kopie genu *FOXO1* u myši s deficitem inzulinového receptoru obnovuje insulinovou senzitivitu a opravuje diabetický fenotyp tím, že se sníží exprese glukoneogenních enzymů v buňkách jater a zároveň se zvýší exprese insulin-senzitivních genů v adipocytech<sup>42</sup>. Oproti tomu bylo pozorováno, že mutace zaměřená na pankreatické buňky a jaterní  $\beta$ -buňky, která způsobovala zvýšení aktivity FOXO1, vedla ke vzniku diabetu mellitu typu 2 v důsledku zvýšené produkce glukosy a snížené kompenzace  $\beta$ -buňkami.

## 2.5.2. Transkripční faktor forkhead box O3

Dalším členem podskupiny FOXO proteinů je FOXO3, v literatuře dohledatelný také pod názvem FKHL1. Gen *FOXO3A* byl identifikován během studia chromozomálních translokací u pacienta s akutní myeloidní leukémií<sup>43</sup>. Je jedním z mála genů, který je spojován s lidskou dlouhověkostí. Jeho vliv na délku života byl prokázán u mnoha modelových organismů<sup>44-46</sup>. Mimo jiné se podílí také na regulaci celé řady buněčných procesů, které zahrnují apoptózu, proliferaci, regulaci buněčného cyklu, reakci na oxidační stres a poškození DNA<sup>47</sup>. S mnohostranností jeho funkce je však spojeno i riziko vzniku různých onemocnění v důsledku deregulace exprese či poruchy aktivity. Ukázalo se, že nadměrná exprese FOXO3 účinně inhibuje tumorigenezi u rakoviny prsu<sup>48</sup>. Naopak inaktivace FOXO3 je spojována s iniciací a progresí rakoviny<sup>47</sup>.

Poměrně nedávno bylo nalezeno několik jednonukleotidových polymorfismů (SNP, z angl. single nucleotide polymorphism) lidského FOXO3, které jsou spojeny s dlouhověkostí<sup>49</sup>. Heterozygoti a homozygoti nesoucí protektivní variantu alely měli 1,9 krát, respektive 2,8 krát větší šanci se dožít více jak 95 let v porovnání s homozygotními nositeli neprotektivní varianty. Dále byla studována souvislost protektivní alely s hlavními příčinami úmrtí souvisejícími s věkem jako je ischemická choroba srdeční, rakovina, hypertenze, cukrovka, mrtvice apod<sup>45</sup>. Ukázalo se, že riziko úmrtí je u nositelů protektivní alely o 10 % nižší, přičemž ischemická choroba srdeční je jedinou příčinou smrti spojenou s přítomností neprotektivní varianty.

Dle teorie stárnutí kmenových buněk se předpokládá, že hlavní hnací silou stárnutí organismu je postupná ztráta schopnosti dospělých kmenových buněk přispívat k homeostáze tkání<sup>50</sup>. Pro dosažení dlouhověkosti je tedy naprosto zásadní schopnost udržet homeostázu kmenových buněk. V tomto ohledu byla opakovaně prokázána role FOXO3. Například nezmar obecný nevykazuje žádné známky stárnutí, neboť neustále dochází k velice účinné obnově a proliferaci jeho kmenových buněk v závislosti na FOXO<sup>51</sup>. Podobně je proliferace kmenových buněk regulována také u *C. elegans*<sup>52</sup> nebo *Drosophila*<sup>53</sup>.

## 2.5.3. Transkripční faktor forkhead box O4

Forkhead box O4 (FOXO4), také známý jako AFX (z angl. acute leukemia fusion gene from chromosome X) byl původně popsán v důsledku chromozomální translokace u pacienta s akutní

lymfoblastickou leukémií<sup>54</sup>. Savčí protein FOXO4 je exprimován v různých tkáních včetně mozku, ledvin, kůže, plic, prostaty a svalů. Nejvyšší míru exprese však vykazuje kosterní svalovina<sup>55</sup>. Exprese FOXO4 je silně ovlivňována malými nekódujícími molekulami RNA (zejména mikroRNA)<sup>54</sup>. V poslední době bylo popsáno velké množství mikroRNA, které snižují hladinu mRNA FOXO4 a inhibují jeho schopnost řídit buněčný cyklus. Snížená exprese FOXO4 korelující s vysokými hladinami mikroRNA byla detekována u buněčných linií různých typů karcinomů<sup>56-58</sup>. V budoucnu by proto zlepšení exprese FOXO4 podáváním anti-mikroRNA léčiv mohlo být potenciální strategií v léčbě celé řady nemocí s vysokou úmrtností<sup>54</sup>. Je však zapotřebí dalšího výzkumu k objasnění komplexní regulace exprese FOXO4 skrze mikroRNA a to nejen prostřednictvím přímé vazby, ale i nepřímo.

Jakožto transkripční faktor má FOXO4 klíčovou roli v regulaci genů, které souvisejí s odpovědí na oxidační stres, zástavou buněčného cyklu a s apoptózou<sup>54</sup>. Nejvýznamnější funkcí je zprostředkování buněčné odpovědi na oxidační stres. Součástí antioxidantního programu je například aktivace transkripce antioxidantních enzymů jako je superoxiddismutasa 2 nebo katalasa<sup>59</sup>. Na druhou stranu reaktivní formy kyslíku (ROS, z angl. reactive oxygen species) modulují aktivitu FOXO4. Přiměřená hladina ROS specificky aktivuje posttranslační modifikace FOXO4, které vedou k jeho jaderné translokaci<sup>60</sup>. Naopak příliš velký oxidační stres vede k inhibici FOXO4 a k inaktivaci antioxidantního programu<sup>61</sup>.

### Interakce transkripčních faktorů forkhead box O4 a p53

Proteiny FOXO a p53 jsou transkripčními faktory, jejichž funkce jsou úzce propojeny<sup>62</sup>. Podílejí se na řízení buněčného cyklu, metabolismu i apoptózy a regulují řadu společných cílových genů včetně *WIF1*, *FASLG*, *GADD45*, *PA26* a *p21* (cit<sup>63</sup>). Velkou pozornost poslední dobou přitahuje zejména jejich vliv na stárnutí organismu. Stárnutí neboli senescence je definováno jako buněčný stav, při němž dochází k ireversibilní zástavě buněčného cyklu.

V nedávné studii se ukázalo, že interakce proteinu FOXO4 s p53 podporuje akumulaci p21 v senescentních buňkách, čímž dochází k zastavení buněčného cyklu a potlačení apoptózy<sup>64</sup>. Ačkoli již senescentní buňky nemají schopnost proliferovat, zůstávají nadále metabolicky aktivní. Od proliferujících buněk se liší svou odolností vůči apoptóze a sekrečním fenotypem asociovaným se senescencí (SASP, z angl. senescence-associated secretory phenotype). S postupem času se senescentní buňky hromadí a prostřednictvím SASP negativně ovlivňují buněčné mikroprostředí tím, že do něj uvolňují prozánětlivé cytokiny, růstové faktory

a proteasy<sup>65,66</sup>. V důsledku toho dochází k urychlení stárnutí a rozvoji různých onemocnění souvisejících s věkem (např. rakoviny). Velké úsilí je proto věnováno výzkumu a návrhům léčiv, která by nějakým způsobem zajistila eliminaci senescentních buněk. V této souvislosti se ukázalo, že rozrušení interakce proteinu FOXO4 s p53 způsobuje translokaci proteinu p53 z jádra, což vede k apoptóze senescentních buněk<sup>64</sup>. U myších modelů se tímto mechanismem podařilo obnovit homeostázu tkání a zlepšit hustotu srsti a renální funkci ledvin.

## 2.5.4. Transkripční faktor forkhead box O6

Posledním členem FOXO podskupiny je FOXO6, který, na rozdíl od ostatních členů, získal ve výzkumu nejméně pozornosti. To plyne z původních zpráv o tom, že je jeho exprese omezena pouze na mozek<sup>67</sup>. Později se však ukázalo, že je exprimován také v periferních tkáních včetně jater, střev, plic, ledvin, svalů a tukových buněk, což odpovídá široké tkáňové distribuci typické pro všechny FOXO proteiny<sup>68</sup>.

Ačkoli se FOXO6 řadí do podskupiny FOXO, v některých ohledech se podstatně liší od ostatních členů<sup>69</sup>. První odlišností je nízký stupeň sekvenční homologie, který činí přibližně 30 %. Dalším rozdílem je to, že jsou ve forkhead DBD obsažena pouze dvě fosforylační místa pro PKB/Akt, zatímco ostatní členové obsahují tři vysoce konzervovaná fosforylační místa. Nejzásadnějším rozdílem je však absence motivu, který u ostatních členů odpovídá jadernému exportnímu signálu (NES). To souvisí i s tím, že FOXO6, navzdory fosforylaci, zůstává v jádře bez ohledu na působení insulínu, zatímco ostatní členové podstupují subcelulární redistribuci<sup>70</sup>. Ukázalo se, že přestože FOXO6 nevystupuje z jádra, je působením insulínu inhibována jeho schopnost vázat DNA. To naznačuje, že inhibice aktivity FOXO a transport z jádra jsou dvě rozličné události<sup>69</sup>.

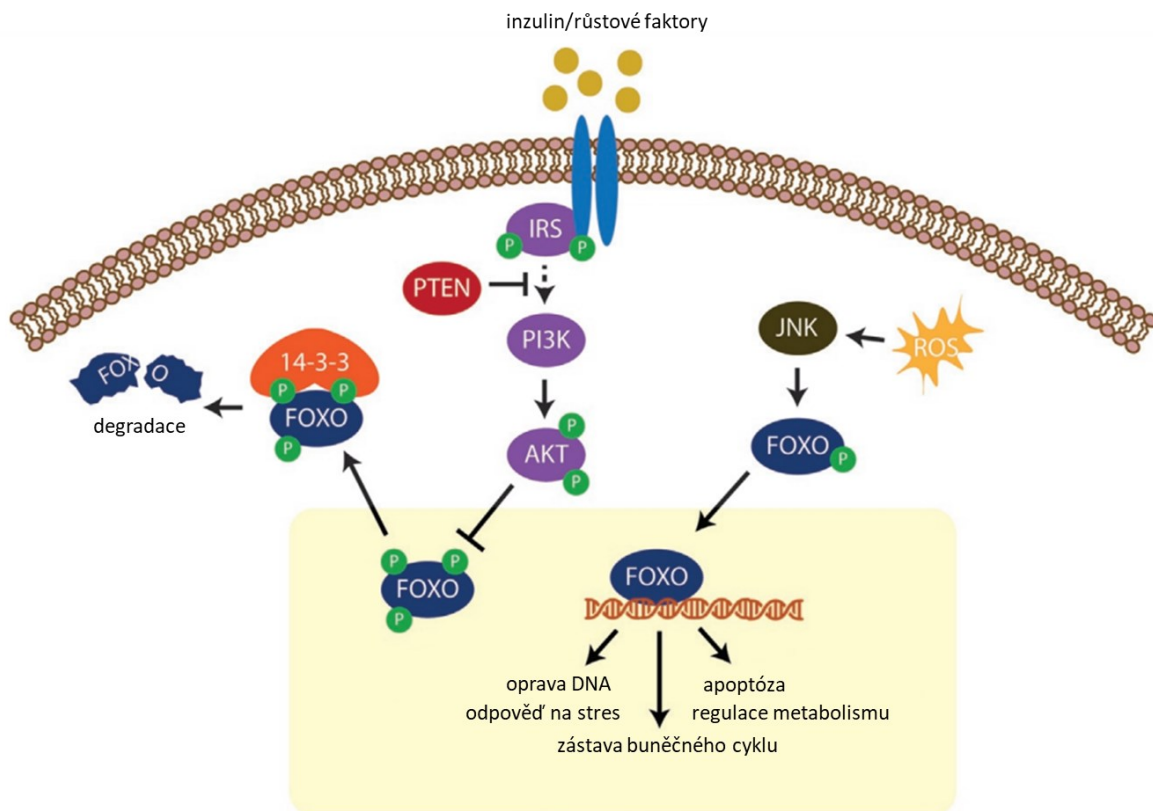
Poměrně nedávno byla popsána role FOXO6 jakožto regulátoru metabolismu glukosy v játrech<sup>68</sup>. Ukázalo se, že FOXO6 stimuluje expresi klíčových enzymů glukoneogeneze (konkrétně expresi fosfoenolpyruvátkarboxykinasy a glukosa-6-fosfatasy). U hladovějících myší byla detekována výrazně zvýšená aktivita jaterního FOXO6, zatímco u nasycených myší zůstala na nízké úrovni.

## 2.5.5. Regulace aktivity forkhead box O proteinů

Proteiny FOXO jsou aktivovány metabolickým a oxidačním stresem a také absencí růstových faktorů<sup>30</sup>. Podléhají regulaci na několika úrovních, které zahrnují posttranslační modifikace (včetně methylace, fosforylace, acetylace a ubikvitinace), jaderně-cytoplasmatickou lokalizaci FOXO a jejich regulátorů a interakce s dalšími transkripčními faktory. Biologická role FOXO spočívá v reakci na stresové podmínky a obecně tedy platí, že působí proti nim tak, aby byla zachována homeostáza. Zpočátku byly FOXO charakterizovány jako nádorové supresory. Později se však prokázalo, že mohou působit jako onkogeny. Tato dvojí role je v souladu s postulátem, že FOXO regulují homeostázu normálních i rakovinných buněk.

### Fosforylace

FOXO proteiny jsou negativně regulovány pomocí inzulinové signalizační kaskády. Vazbou inzulinu či růstových faktorů na buněčný receptor s intracelulární tyrosinkinasovou doménou se prostřednictvím signálních proteinů IRS (z angl. insulin receptor substrate) aktivuje fosfatidylinositol-3-kinasa (PI3K) a dochází ke vzniku druhých posílů, kteří dále aktivují fosfoinositid-dependentní kinasu 1 (PDK1) a PKB (také známá jako Akt kinasa)<sup>30,71</sup>. Aktivní PKB se translokuje do jádra a fosforyluje FOXO na třech evolučně konzervovaných zbytcích Ser a Thr, přičemž jeden je umístěn blízko N-konce, druhý se nachází v oblasti NLS a třetí v oblasti konzervované sekvence NES. Výjimku představuje FOXO6, kterému jedno fosforylační místo, nacházející se v oblasti NES, chybí<sup>72</sup>. Stejně zbytky Ser a Thr, které fosforyluje PKB, mohou být fosforylovány sérem a glukokortikoid-regulovanou kinasou (SGK)<sup>71</sup>. Fosforylace FOXO pomocí PKB má za následek vznik dvou vazebných míst pro protein 14-3-3 (cit<sup>30</sup>). Vazba proteinu 14-3-3 na FOXO poté zcela inhibuje jeho schopnost vázat DNA a vzniklý komplex FOXO:14-3-3 je translokován z jádra do cytoplasmy (Obr. 2.6, str. 25).



**Obr. 2.6 – Regulace aktivity a subcelulární distribuce FOXO pomocí insulinové signální kaskády.** V přítomnosti insulinu či růstových faktorů dochází k aktivaci proteinů IRS. Ty dále aktivují PI3K-PKB dráhu, v jejímž důsledku je FOXO protein fosforylován. Fosforylací se vytvoří dvě vazebná místa pro protein 14-3-3, který způsobí vyloučení komplexu z jádra do cytoplasmy. Tím dojde k inhibici transkripční aktivity FOXO. Homolog fosfatasy a tenzinu (PTEN) podporuje aktivaci FOXO inhibicí PI3K. Aktivita a jaderná lokalizace FOXO je podporována reaktivními formami kyslíku (ROS) prostřednictvím JNK. Převzato a upraveno<sup>71</sup>.

FOXO se mohou, zejména v období velkého buněčného stresu, kdy se generuje velké množství reaktivních forem kyslíku (ROS) translokovat opačnou cestou z cytoplasmy směrem do jádra<sup>30</sup>. Vlivem Jun N-koncové kinasy (JNK) dochází k inhibici inzulínové signalizace a k fosforylaci FOXO, což vede k jeho uvolnění z komplexu s proteinem 14-3-3. Následně je FOXO translokován do jádra, kde transaktivuje promotory cílových genů. Podobný efekt má i savčí Ste-20 podobná kinasa 1 (MST1)<sup>36</sup>.

Krom těchto zmíněných kinas může být FOXO fosforylováno celou řadou dalších, jako je například cyklin-dependentní kinasa 1, AMP-aktivovaná proteinkinasa či MAPK-aktivovaná proteinkinasa<sup>30</sup>.

## Acetylace

Savčí FOXO proteiny jsou v reakci na oxidační stres acetylovány pomocí p300 a CREB vázajícího proteinu (CBP, z angl. CREB binding protein)<sup>71</sup>. Bylo zjištěno, že acetylace FOXO proteinu může zvyšovat i snižovat jeho transkripční aktivitu. Ukázalo se, že acetylace pomocí p300 zvyšuje transkripční aktivitu FOXO proteinů a tento účinek lze zvrátit pomocí deacetylasy SIRT1 (cit<sup>73</sup>). Oproti tomu acetylace pomocí CBP inhibuje transkripční aktivitu FOXO a SIRT1 zmírňuje účinek této inhibice<sup>74</sup>. Přesný mechanismus modulace transkripční aktivity FOXO prostřednictvím acetylace a deacetylace není zatím známý. Ukázalo se však, že acetylace zbytků umístěných v oblasti forkhead DBD ovlivňuje schopnost FOXO vázat DNA<sup>75</sup>.

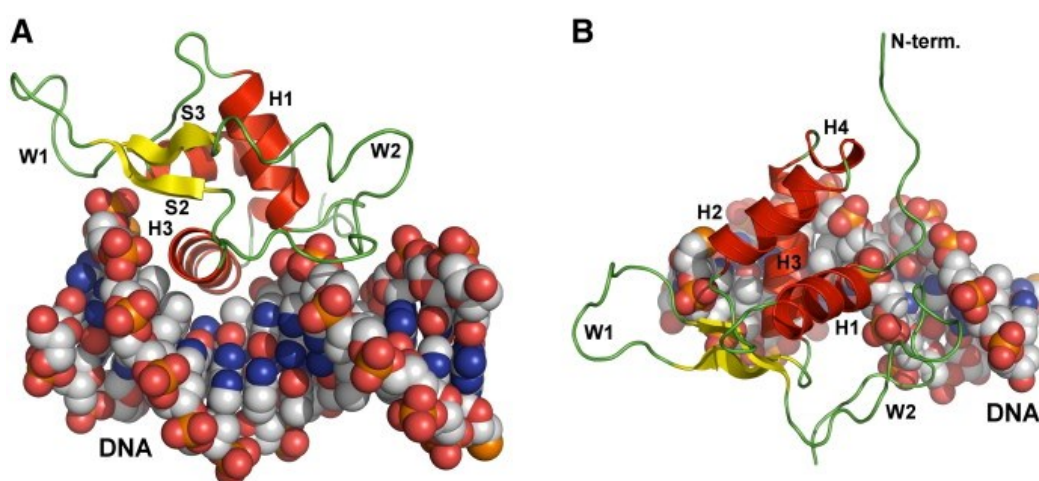
## Ubikvitinace

Ubikvitin je evolučně konzervovaný, 76 aminokyselinových zbytků dlouhý polypeptid, který je součástí ubikvitin-proteasomového systému pro degradaci proteinů. Jeho název je odvozen z lat. *ubique*, což znamená „všude“, neboť je exprimován ve všech eukaryotických buňkách. Ubikvitinace je třístupňový proces, při němž dochází ke konjugaci ubikvitinu s daným proteinem. Nejprve musí dojít k připojení ubikvitinu na ubikvitin-aktivující enzym (proces závislý na ATP). Poté je aktivovaný ubikvitin přenesen na ubikvitin-konjugující enzym a z něj pomocí ubikvitin ligasy na cílový protein za vzniku isopeptidové vazby mezi lysinem substrátu a C-koncovým glycinem ubikvitinu.

Ubikvitin ligasy FOXO proteinů zahrnují například MDM2 (z angl. mouse double minute 2) nebo Skp2 (z angl. S-phase kinase associated protein 2)<sup>76</sup>. Oba tyto enzymy vyžadují předchozí fosforylaci FOXO proteinu. Zajímavé je, že MDM2 může indukovat buď mono- nebo polyubikvitinaci. Zatímco polyubikvitinace má za následek degradaci FOXO proteinu, monoubikvitinace umožňuje jeho translokaci do jádra a zvýšení transkripční aktivity.

## 2.5.6. Interakce forkhead box proteinů s DNA

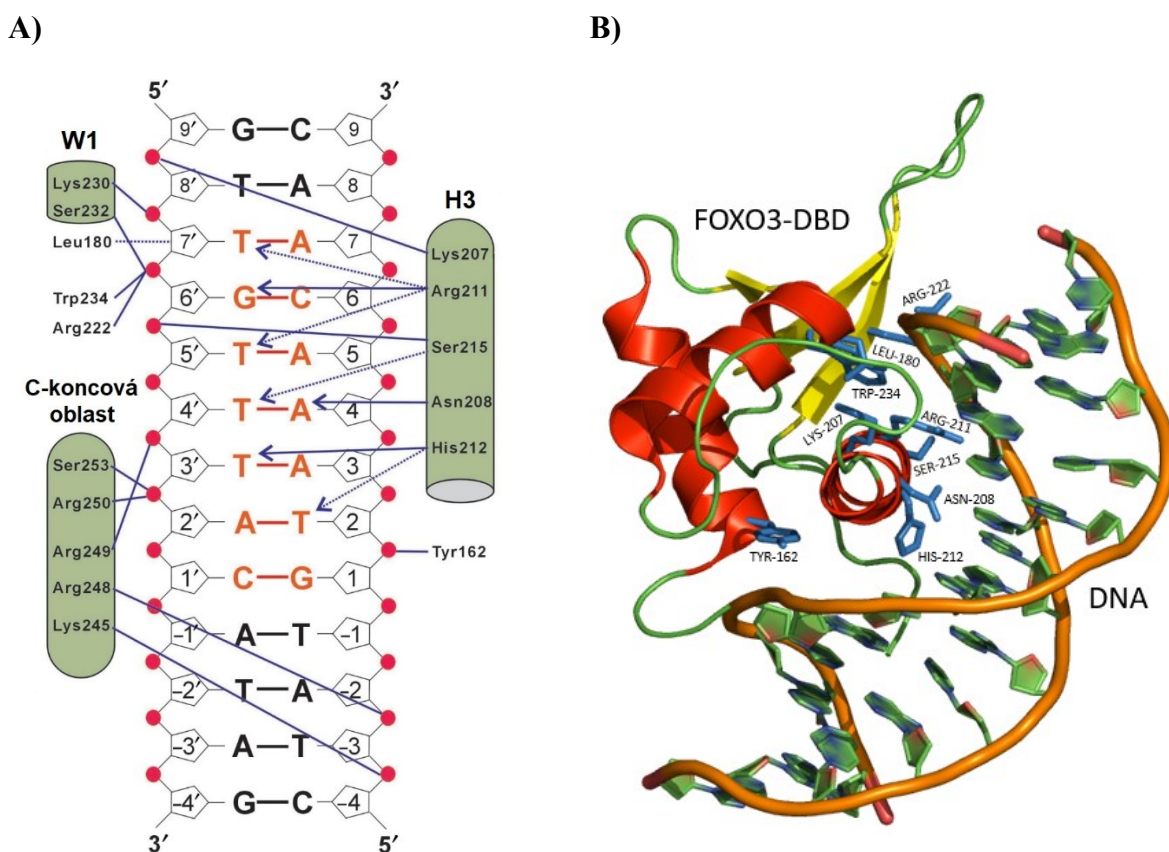
První vyřešenou krystalovou strukturou forkhead domény vázané na konsenzuální sekvenci DNA byla struktura komplexu FOXA3-DNA (Obr. 2.7) (cit<sup>33</sup>). Protein FOXA3 interaguje s DNA jako monomer prostřednictvím přímých a vodou zprostředkovaných interakcí. Bylo zjištěno, že hlavním DNA-vazebným elementem je  $\alpha$ -helix H3, který interaguje s bázemi DNA v oblasti velkého žlábkku, do něhož je vmezeřen a orientován téměř kolmo k ose DNA. Vazba proteinu FOXA3 indukuje ohyb DNA o 13°, čímž dochází k zúžení velkého žlábkku, v němž je  $\alpha$ -helix H3 umístěn.



**Obr. 2.7 – Krystalová struktura komplexu FOXA3-DNA<sup>33</sup>.** A) Forkhead DBD je zobrazena jako stuhový model a DNA jako sférický model. B) Komplex byl otočen o 90° kolem vodorovné osy směrem ke čtenáři. Jednotlivé elementy sekundární struktury jsou označeny dle nomenklatury FOX proteinů. Převzato a upraveno<sup>36</sup>.

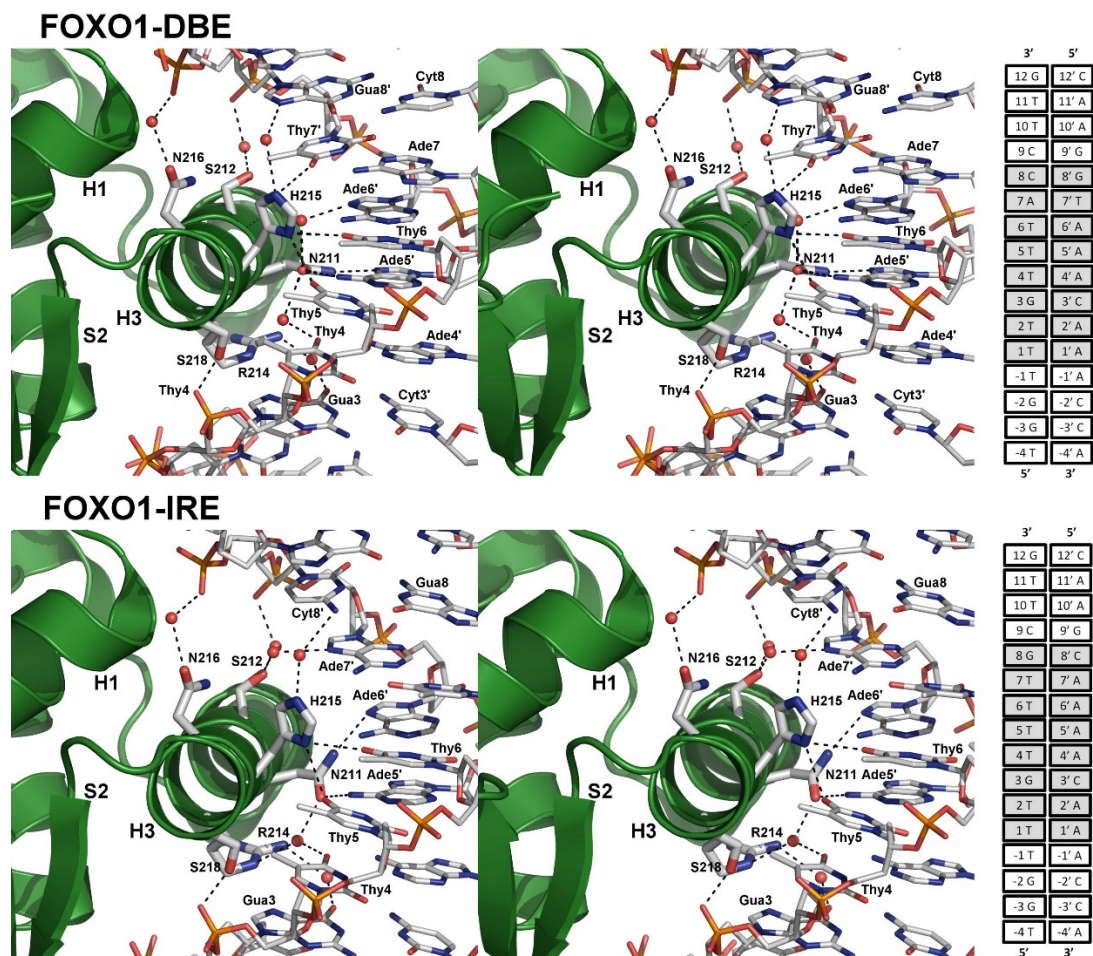
Od vyřešení první struktury proteinu z rodiny FOX bylo v průběhu let popsáno mnoho dalších struktur, u nichž byl pozorován velmi podobný způsob rozpoznávání DNA jako u komplexu FOXA3-DNA<sup>36</sup>. V této práci je pozornost věnována především „O“ podskupině FOX proteinů, u níž bylo (dle očekávání) zjištěno, že většinu bázově-specifických kontaktů zprostředkovává  $\alpha$ -helix H3 prostřednictvím jak přímých vodíkových vazeb, tak van der Waalsových interakcí. Zbylé interakce s DNA tvoří převážně křídla W1 a W2, ty však vykazují podstatně vyšší variabilitu (Obr. 2.8, str. 28). V komplexu FOXA3-DNA se W1 a W2 účastní přímých i vodou zprostředkovaných interakcí s bázemi DNA<sup>33</sup>, zatímco ve všech komplexech FOXO-DNA vytváří pouze nespecifické interakce s fosfátovou páteří DNA<sup>38,75,77</sup>. Toto zjištění naznačuje, že oblasti křídel pomáhají ke stabilizaci komplexu protein-DNA, ale významně nepřispívají k rozpoznávání cílové DNA. Struktura FOXO3-DNA ukázala, že tři bazické zbytky argininu v pozicích 248, 249 a 250 tvoří iontové interakce s fosfátovými skupinami

velkého žlábků, aniž by specificky interagovaly s bázemi DNA<sup>75</sup>. Případné zkrácení křídla W2 (umístěného na C-konci) nebo substituce uvedených argininových zbytků alaninem vede k výraznému snížení vazebné afinity FOXO k DNA, což vypovídá o jejich důležitosti pro stabilizaci komplexu FOXO-DNA<sup>38,75</sup>. Kromě  $\alpha$ -helixu H3 a křídel W1 a W2 má důležitou stabilizační roli N-koncový segment forkhead DBD<sup>36</sup>. Několik aminokyselinových zbytků umístěných na N-konci tvoří přímé i vodou zprostředkované interakce s fosfátovými skupinami DNA a jsou tedy nedílnou součástí DNA-vazebného povrchu.



**Obr. 2.8 – Přehled interakcí v rámci komplexu FOXO3-DNA.** A) Schéma kontaktů mezi forkhead DBD proteinu FOXO3 a DNA. Oranžově jsou vybarveny báze, které jsou součástí konsenzuální sekvence DNA specificky rozpoznávané FOXO proteiny. V zelených rámečcích jsou vypsány aminokyselinové zbytky účastnící se interakce s DNA. Plné čáry znázorňují vodíkové můstky a přerušované van der Waalsovy interakce. Pokud je plná či přerušovaná čára zakončena šipkou, jedná se o přímý kontakt aminokyselinového zbytku s bází DNA. Pokud ne, jedná se o interakci s fosfátovou páteří DNA (fosfátové zbytky znázorněny jako červené koule). Převzato a upraveno<sup>75</sup>. B) Komplex FOXO3-DNA (PDB ID: 2UZK) zobrazený včetně aminokyselinových zbytků účastnících se interakce s DNA. FOXO3-DBD je zobrazen jako stuhový model s červeně zbarvenými  $\alpha$ -helixy a žlutě zbarvenými  $\beta$ -skládanými listy. Vytvořeno v programu PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, verze 2.3.3 Schrödinger, LLC).

Všichni členové „O“ podtřídy FOX transkripčních faktorů rozpoznávají dvě konsenzuální sekvence: 5'-GTAAA (T/C) AA-3' známou jako vazebný element rodiny DAF-16 (DBE)<sup>35</sup> a 5'-(C/A) (A/C) AAA (C/T) AA-3' známou jako element reagující na inzulin (IRE)<sup>37</sup>. Obě sekvence jsou si velmi podobné a obsahují hlavní sekvenci 5'-(A/C) AA (C/T) A-3' rozpoznávanou všemi forkhead proteiny<sup>23</sup>. Na základě studií krystalových struktur komplexů FOXO-DNA bylo zjištěno, že FOXO proteiny vážou sekvenci DBE s vyšší afinitou. Předpokládá se, že je to důsledkem rozdílů v tvorbě vodíkových můstků a vodou zprostředkovaných interakcí mezi DNA a forkhead DBD (Obr. 2.9).



**Obr. 2.9 – Přehled interakcí mezi  $\alpha$ -helixem H3 forkhead DBD proteinu FOXO1 a DNA obsahujícími konsenzuální sekvence.** Nahoře jsou znázorněny interakce mezi H3 FOXO1 a sekvencí DBE 5'-GTAAACA-3'. Dole jsou znázorněny interakce mezi H3 FOXO1 a sekvencí IRE 5'-CAAAAACA-3'. Sekvence DNA je vždy uvedena vpravo. Molekuly vody jsou znázorněny jako červené koule. Převzato<sup>36</sup>.

### 3. Cíle práce

- Exprese a purifikace DNA-vazebných domén proteinů FOXO1, FOXO3 a FOXO4
- Exprese a purifikace transaktivační domény proteinu p53
- Charakterizace DNA-vazebných afinit FOXO proteinů
- Posouzení vlivu interakce p53 s FOXO na DNA-vazebnou afinitu FOXO-DBD

## 4. Materiál a přístroje

### 4.1. Použité chemikálie

1,4-dithiotreitol (DDT).....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
ampicilin.....	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
citrát sodný .....	PENTA (Česká republika)
Coomassie Brilliant Blue G 250.....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného .....	PENTA (Česká republika)
dihydrogenfosforečnan draselný .....	PENTA (Česká republika)
dodecylsírán sodný (SDS).....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
EDTA .....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
ethanol .....	PENTA (Česká republika)
fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF).....	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
glutathion.....	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
glycerol.....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
hovězí sérový albumin .....	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
hydroxid sodný.....	PENTA (Česká republika)
chloramfenikol .....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
chlorid draselný .....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
chlorid sodný .....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
imidazol.....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
isopropanol .....	LACHNER a.s. (Česká republika)
isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG).....	EMD Biosciences, Inc. (Německo)
kanamycin .....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
kyselina chlorovodíková .....	PENTA (Česká republika)
LB médium.....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
lysozym .....	SERVA Electrophoresis GmbH (Německo)
peroxodisírán amonný .....	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
PreScission Proteasa.....	vlastní výroba v laboratoři
Protease inhibitor cocktail tablet (EDTA free) ...	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
Rotiphorese Gel 30.....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)

sepharosa (Chelating Sepharose Fast Flow) .....	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
sepharosa (Glutathion Sepharose Fast Flow) ....	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
síran nikelnatý .....	PENTA (Česká republika)
TEMED .....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
TEV proteasa.....	vlastní výroba v laboratoři
tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris).....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
trombin .....	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
Tween-20.....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
β-merkapt ethanol.....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)

## 4.2. Použité přístroje a pomůcky

analytické váhy ABS 120-4.....	KERN & SOHN (Německo)
centrifuga 5804 R (rotor A-4-44) .....	Eppendorf AG (Německo)
centrifuga K80 (rotor S6/6,6) .....	MLW (Německo)
centrifuga MiniSpin PL-109.....	Eppendorf AG (Německo)
centrifuga Universal 4 x 100 Z323K.....	HERMLE Labortechnik GmbH (Německo)
FPLC ÄKTAprime .....	GE Healthcare (USA)
inkubátor HT Multitron.....	Infors (Švýcarsko)
peristaltická pumpa .....	IDEX Health & Science (Švýcarsko)
pH-metr JENWAY 3505 .....	P-LAB (Česko)
předvážky EG-420 NM .....	KERN & SOHN (Německo)
Sonicator3000 Misonix .....	Cole-Parmer (USA)
spektrofotometr Agilent 8453 .....	Agilent technologies, Inc. (USA)
spektrofotometr IMPLN P300 .....	BioTech (USA)
spektrofotometr NanoDrop .....	Thermo Fisher Scientific, Inc. (USA)
Vortex Zx3 .....	Velp Scientifica (Itálie)
aparatura pro vertikální elektroforézu .....	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)
automatické pipety .....	Eppendorf AG (Německo)
dialyzační membrána Spectra/Por .....	SERVA Electrophoresis GmbH (Německo)
buňky <i>E.coli</i> BL21(DE3) .....	Stratagene Corporation (USA)
buňky Rosetta™ 2 (DE3) .....	Novagen (Německo)

filtry o pórovitosti 0,45  $\mu\text{m}$  .....GE Healthcare (USA)  
 koncentrátořy VIVASPIN TURBO15 ..... Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG  
 (Německo)  
 Chelating Sepharose Fast Flow .....GE Healthcare (Švédsko)  
 injekční stříkačky .....B. Braun Melsungen AG (Německo)  
 kolona HiLoad™ 26/600 Superdex™ 75 pg.....GE Healthcare (USA)  
 kolona HiTrap™ Heparin HP.....GE Healthcare (USA)  
 křemenné kyvety .....Agilent technologies, Inc. (USA)  
 svorky na dialyzační membrány .....SERVA Electrophoresis GmbH (Německo)  
 plastové mikřozkumavky .....Thermo Fisher Scientific, Inc. (USA)  
 mikrodestičky Corning® 384 .....Sigma-Aldrich Corporation (USA)  
 Mono-Q Sepharose Fast Flow .....Amersham Biosciences (Švédsko)  
 přístroj CLARIOstar® .....BMG labtech (Německo)

## 5. Použité metody a pracovní postupy

Následující kapitola je členěna do čtyř podkapitol. První z nich je věnována proteinové expresi a následnému zpracování buněk. Tato část postupu je v podstatě jednotná pro všechny připravované proteiny, narozdíl od zbytku postupu (purifikace), který je specifický pro jednotlivé proteiny. Proto je první kapitola formálně oddělena. Následující dvě podkapitoly popisují purifikační kroky, které vedly k získání DNA-vazebných domén FOXO proteinů a transaktivační domény proteinu p53<sub>(1-93)</sub>, a poslední podkapitola shrnuje postup měření DNA-vazebných afinit pomocí stacionární anisotropie fluorescence.

Purifikace DNA-vazebných domén lidských FOXO proteinů, konkrétně FOXO1<sub>(144-270)</sub>, FOXO3<sub>(142-267)</sub> a FOXO4<sub>(86-211)</sub>, se liší pouze v několika drobných detailech a bylo by nadbytečné psát postup přípravy každé z nich zvlášť. Z tohoto důvodu je v této práci uveden pouze jeden postup a případné odlišnosti jsou popsány přímo v textu práce.

### 5.1. Exprese proteinů a lýza buněk

#### 5.1.1. Transformace bakterií

Transformace bakterií je horizontálním genovým přenosem, při němž bakteriální buňky přijímají cizí genetický materiál z okolního prostředí. Díky tomu mohou bakterie získávat nové vlastnosti, které zvyšují jejich adaptabilitu (například rezistenci na antibiotika). Avšak ne všechny bakterie jsou transformace schopny. Je proto zapotřebí využít tzv. kompetentní buňky, které mají propustnou buněčnou stěnu a umí přijímat exogenní DNA. V následujícím postupu práce byly použity kompetentní buňky *E. coli* BL21 (DE3) a Rosetta™ 2 (DE3). Do buněk BL21 (DE3) byly zavedeny následující plasmidy:

- pET-27b s genem pro FOXO1-DBD<sub>(144-270)</sub> obsahující na N-koncovou histidinovou kotvu, rezistenci na kanamycin a TEV štěpné místo
- pET-27b s genem pro FOXO4-DBD<sub>(86-211)</sub> obsahující N-koncovou histidinovou kotvu, rezistenci na kanamycin a TEV štěpné místo
- pGEX-6P-1 s genem pro p53-TAD<sub>(1-93)</sub> obsahující glutathion-S-transferasu (GST), rezistenci na ampicilin a štěpné místo pro PreScission Proteasu (PP)

Do buněk Rosetta™ 2 (DE3), nesoucích rezistenci na chloramfenikol, byl zaveden pouze plasmid pET-27b s genem pro FOXO3-DBD<sub>(142-267)</sub> obsahující N-koncovou histidinovou kotvu, rezistenci na kanamycin a TEV štěpné místo. Jiná varianta buněk byla použita proto, že se v nich protein exprimoval lépe než v buňkách BL21 (DE3).

## Provedení

Ke 30 µl kompetentních buněk byl přidán 1 µl příslušné plazmidové DNA. Vzniklá směs byla poté jemně promíchána a inkubována na ledu po dobu 30 minut. Po uplynutí této doby byla mikrozkuhavka s buňkami přemístěna na 45 s do vodní lázně o teplotě 42 °C, čímž bylo docíleno teplotního šoku. Následně byla mikrozkuhavka vyjmuta z lázně a uchována na ledu po dobu dvou minut. Dále bylo přidáno 300 µl sterilního média dle Luria-Bertani (LB), které bylo předem vytemperováno na laboratorní teplotu. Směs byla inkubována 1 hodinu při 37 °C za stálého třepání 180 ot./min.

Po inkubaci bylo ze směsi odebráno 100 µl a asepticky převedeno na Petriho misku s LB agarem, který obsahoval příslušné antibiotikum o výsledné koncentraci 100 µg/ml. Petriho miska byla poté inkubována v obrácené poloze jakožto „zavěšený agar“ přes noc při 37 °C.

### 5.1.2. Expese rekombinantních proteinů

Expese rekombinantních proteinů je široce využívanou metodou k získání velkého množství daného proteinu, který se poté využívá pro strukturní a funkční studie. Výhodou expese rekombinantních proteinů je to, že je lze exprimovat ve fúzi s afinitními značkami, které usnadňují jejich následné čištění.

Pro expresi DNA-vazebných domén FOXO proteinů a transaktivační domény proteinu p53 byly jakožto expresní systémy využity bakterie *E. coli* kmene BL21 (DE3) a Rosetta™ 2 (DE3). V předchozím kroku byly do těchto bakteriálních buněk separátně zavedeny plasmidy nesoucí geny pro rezistenci na příslušné antibiotikum, což umožňuje jejich následnou selekci. Na Petriho miskách s antibiotikem se tedy přes noc vytvořily kolonie pouze z těch buněk, které získaly rezistenci přijetím plasmidu. Ty byly dále použity v následujícím postupu.

## Provedení

Do skleněné zkumavky se sterilním tekutým LB médiem o objemu 5 ml bylo přidáno 5  $\mu$ l příslušného antibiotika. Z Petriho misky byla poté v aseptickém prostředí pomocí sterilní očkovací kličky odebrána jedna bakteriální kolonie, která byla přenesena do zkumavky s médiem a antibiotikem. Zkumavka byla opatřena víčkem a následně inkubována za stálého míchání 180 ot./min při 37 °C přes noc. Takto bylo vždy připraveno několik zkumavek, jejichž počet závisel na tom, v kolika litrech média exprese proteinů následující den probíhala (5 ml kultury připadá na 1 l LB média). Obvykle se jednalo o 8-12 litrů LB média.

Následující den byly zkumavky s kulturou vyjmuty z inkubátoru. Každá zkumavka byla promíchána pomocí vortexu a přidána k 1 l tekutého sterilního LB média, které již obsahovalo příslušné antibiotikum o výsledné koncentraci 100  $\mu$ g/ml. Nádoby s médiem a kulturou byly poté inkubovány při 37 °C za stálého třepání 190 ot./min. V průběhu kultivace byla měřena optická denzita (OD) při 600 nm (slepým vzorkem bylo čisté LB médium). Když bylo dosaženo určité hodnoty OD (viz dále), započalo snižování teploty uvnitř třepačky. V případě bakterií nesoucích geny pro FOXO proteiny byla hraniční hodnota OD 0,6  $\text{cm}^{-1}$  a teplota se po jejím dosažení snižovala na 20 °C. U bakterií nesoucích plasmid s genem pro protein p53 byla hraniční hodnota OD 0,3  $\text{cm}^{-1}$  a teplota se následně snižovala na 25 °C. Při snížené teplotě byly nádoby s kulturou inkubovány, dokud OD nedosáhla hodnoty 0,8  $\text{cm}^{-1}$  (bakterie s geny pro FOXO proteiny) a 0,7  $\text{cm}^{-1}$  (bakterie s genem pro protein p53). Po dosažení zmíněné hodnoty OD byla v každé nádobě indukována exprese přidavkem IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid) o koncentraci 0,5  $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Přídavek činil 1 ml pro bakterie s geny pro FOXO proteiny (výsledná koncentrace IPTG v bání byla 0,5  $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) a 2 ml pro bakterie s genem pro protein p53 (výsledná koncentrace IPTG v bání byla 1  $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ). Po indukci byla kultura inkubována přes noc při snížené teplotě za stálého míchání 190 ot./min.

Další den byly kultury 20 minut centrifugovány při 4 °C a 2073 $\times$ g. Supernatant byl poté odstraněn a pelety byly pomocí vortexu šetrně resuspendovány v lyzačním pufru (Tab. 5.1 na str. 37). Peleta získaná centrifugací 1 l kultury byla resuspendována ve 30 ml lyzačního pufru. Resuspendované buňky byly přelity do plastových lahví a zamraženy v -80 °C. Tabulka 5.2 na str. 37 shrnuje složení fosfátového pufru (PBS), který byl použit pro přípravu lyzačního pufru.

**Tabulka 5.1** – Složení lyzačního pufru

Složka	Výsledná koncentrace
<b>PBS</b>	1× koncentrovaný
<b>NaCl</b>	1 mol·dm <sup>-3</sup>
<b>β-merkapt ethanol</b>	4 mmol·dm <sup>-3</sup>
<b>imidazol</b>	2 mmol·dm <sup>-3</sup>

Doplněno deionizovanou vodou.

**Tabulka 5.2** – Složení 10× koncentrovaného PBS pufru (pH = 7,4)

Složka	Hmotnost [g]
<b>NaCl</b>	80,0
<b>KCl</b>	2,0
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	2,4
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O</b>	14,4
<b>NaN<sub>3</sub></b>	0,4

Doplněno deionizovanou vodou na výsledný objem 1 l.

### 5.1.3. Sonikace

Sonikace je široce používaná laboratorní metoda, kterou lze využít k rozbití velkých částic v roztoku. Jedná se o chemický a fyzikální proces vycházející z procesu akustické kavitace, což je jev, při němž ultrazvukové vlny vytvářejí v roztoku mikroskopické bubliny, které působením akustického pole kolabují. Tím vytvářejí silné vibrační vlny, které rozbíjejí velké částice. Obvykle se využívají ultrazvukové frekvence (>20 kHz) a tak se někdy této metodě přezdívá ultrasonikace. Lze ji provádět pomocí ultrazvukové lázně nebo ultrazvukové sondy (sonikátoru). V průběhu sonikace se vytváří teplo, a tak je zapotřebí vzorek po celou dobu uchovávat na ledu, aby nedošlo k denaturaci proteinů.

## Provedení

Zmražený roztok buněk byl při laboratorní teplotě ponechán rozmraznout. Poté byl za stálého míchání inkubován s lysozymem (o celkové koncentraci 0,1 mg/ml) po dobu 40 minut při 4 °C ve skleněné kádince. Po uplynutí doby inkubace byl přidán PMSF (fenylmethylsulfonylfluorid) o celkové koncentraci 1 mmol·dm<sup>-3</sup> a kádinka s roztokem byla umístěna do ledové lázně. Dále byl vzorek sonikován pomocí ultrazvukové sondy. Sonikace vzorku o objemu 100 ml trvala celkem 15 minut při výkonu 55 W s tím, že byla v polovině přerušena kvůli promíchání vzorku. Cyklus byl nastaven na 10 s ultrazvukových pulsů a 30 s pauzy. Poté byl sonikát převeden do centrifugačních kyvet a 45 minut centrifugován při 4 °C a 20 000×g. Centrifugací byl získán supernatant, který byl uchován při 4 °C a použit v dalším kroku.

## 5.2. Purifikace DNA-vazebných domén FOXO

### 5.2.1. Niklová chelatační chromatografie

Niklová chelatační chromatografie je typem afinitní chromatografie, která využívá afinity některých aminokyselin k iontům těžkých kovů imobilizovaných na pevném nosiči. V tomto případě se jedná o vznik koordinačně-kovalentní vazby mezi nikelnatými ionty na nosiči a dusíkovými atomy postranního řetězce histidinu proteinu. S rostoucím počtem histidinů v proteinu roste i síla, s jakou se daný protein na matici váže. Proto se rekombinantní proteiny připravují ve fúzi s tzv. histidinovou kotvou (his-tagem), což je sekvence šesti histidinů umožňující oddělení žádoucího proteinu od zbytku buněčné směsi.

## Provedení

Při purifikaci jednotlivých FOXO-DBD byla použita kolona naplněná sepharosou (Chelating Sepharose Fast Flow) o objemu 3 ml. Kolona byla nejprve připojena k peristaltické pumpě a promyta dle následujícího postupu: 15 ml deionizované vody, 60 ml roztoku síranu nikelnatého (o koncentraci 0,1 mol·dm<sup>-3</sup>), 15 ml deionizované vody a 15 ml pufru E (Tab. 5.3 na str. 39). Poté byla sepharosa z kolony vyjmuta a za stálého míchání inkubována s buněčným extraktem po dobu jedné hodiny při 4 °C. Po uplynutí doby inkubace byla kolona umístěna na led a za nízké průtokové rychlosti byl přidáván buněčný extrakt s maticí. Následovalo promývání: 50 ml pufru E a poté 300 ml 10% (v/v) pufru F v pufru E. To vedlo k odstranění

nespecificky vázaných proteinů. Poté byla kolona odpojena od peristaltické pumpy a následovala eluce proteinu pomocí pufru F (15 ml) působením gravitace. Přítomnost žadoucího proteinu v roztoku byla ověřena metodou SDS-PAGE v 15% polyakrylamidovém gelu.

**Tabulka 5.3** – složení pufrů E a F pro niklovou chelatační chromatografii

Pufř E:		Pufř F:	
Složka	Výsledná koncentrace	Složka	Výsledná koncentrace
PBS pufř	1×	PBS pufř	1×
NaCl	0,5 mol·dm <sup>-3</sup>	NaCl	0,5 mol·dm <sup>-3</sup>
β-merkapt ethanol	2 mmol·dm <sup>-3</sup>	β-merkapt ethanol	2 mmol·dm <sup>-3</sup>
imidazol	1 mmol·dm <sup>-3</sup>	imidazol*	0,5 mol·dm <sup>-3</sup>

Oba roztoky byly do požadovaného objemu doplněny deionizovanou vodou. Hodnota pH pufru F byla upravena koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou na 8,0. Složení 10× PBS pufru je uvedeno v Tab. 5.2 na str. 37.

\*Uvedená koncentrace imidazolu platí pro purifikaci FOXO3<sub>(142-267)</sub>, pro purifikaci FOXO4<sub>(86-211)</sub> byla použita koncentrace 0,6 mol·dm<sup>-3</sup> a pro FOXO1<sub>(144-270)</sub> 0,4 mol·dm<sup>-3</sup>.

### 5.2.2. Dialýza

Dialýza je separační metoda umožňující oddělení malých molekul (jako jsou například soli či redukční činidla) od makromolekul (proteiny, DNA) pomocí difúze skřze polopropustnou membránu. Zatímco malé molekuly pronikají otvory v dialyzační membráně po svém koncentračním spádu, makromolekuly jsou příliš velké na to, aby otvory prošly, a tak zůstávají zachyceny uvnitř. Proces výměny malých molekul se zastaví v okamžiku, kdy dojde k vyrovnání koncentrací vně a uvnitř membrány. Proto je nutné použít, vzhledem k objemu vzorku, dostatečné množství dialyzačního pufru.

### Provedení

Roztok proteinu získaný předchozím krokem byl převeden do dialyzační membrány s propustností molekul menších než 6-8 kDa. Následně byl dialyzován dvě hodiny při 4 °C v 1 l

pufry pro heparinovou afinitní chromatografii (Tab. 5.4 na str. 41). Po uplynutí této doby byla změřena absorbance vzorku při 280 nm proti dialyzačnímu pufry a pomocí Lambert-Beerova zákona byla vypočtena přibližná molární koncentrace proteinu. Dle množství proteinu byla poté pro odštěpení histidinové kotvy přidána TEV proteasa (protease viru tabákové mozaiky, z angl. Tobacco Etch Virus), přičemž 250 U (odpovídající 31,25  $\mu$ l) bylo použito na štěpení 1 mg fúzního proteinu. Poté byla dialyzační membrána s roztokem proteinu přesunuta do 1 l nově připraveného dialyzačního pufry a dialyzována přes noc při 4 °C. Odštěpení histidinové kotvy bylo následující den ověřeno metodou SDS-PAGE v 15% polyakrylamidovém gelu.

### 5.2.3. Heparinová afinitní chromatografie

Heparin je vysoce sulfatovaný polysacharid řadící se do rodiny glykosaminoglykanů. Jeho biologickou funkcí je inhibice koagulační kaskády, avšak jeho schopnost interagovat s celou řadou proteinů se využívá pro purifikaci rekombinantních proteinů. V případě afinitní chromatografie se heparin používá kovalentně navázaný na porézních kuličkách. Působí jednak jako specifický ligand, ale díky přítomnosti velkého množství sulfátových skupin funguje také jako katex (iontoměnič). Výhodou použití heparinové afinitní chromatografie je, že není nutná přítomnost afinitní značky, a navíc tak dochází ke zkoncentrování roztoku proteinu, což zjednodušuje provedení následujících purifikačních kroků.

#### Provedení

Heparinová afinitní chromatografie byla provedena na koloně HiTrap™ Heparin HP připojené k ÄKTAprime pro FPLC. Roztok proteinu i pufry byly přefiltrovány přes filtry s velikostí pórů 0,45  $\mu$ m. Kolona byla ekvilibrována pufrem pro heparinovou afinitní chromatografii (Tab. 5.4 na str. 41) a průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml/min. Následně byl roztok proteinu postupně nanesen na kolonu a poté eluován gradientem koncentrace chloridu sodného pomocí elučního pufry (Tab. 5.5, na str. 41). Frakce obsahující žádoucí protein byly uchovány v 1,5ml plastových mikrozkuvkách na ledu. Přítomnost proteinu byla ověřena metodou SDS-PAGE v 15% polyakrylamidovém gelu.

**Tabulka 5.4** – složení pufru pro heparinovou afinitní chromatografii (také dialyzační pufr)

Složka	Výsledná koncentrace
<b>1 mol·dm<sup>-3</sup> Tris-HCl (pH = 7,5)</b>	20 mmol·dm <sup>-3</sup>
<b>NaCl</b>	100 mmol·dm <sup>-3</sup>
<b>0,5 mol·dm<sup>-3</sup> EDTA (pH = 8,0)</b>	1 mmol·dm <sup>-3</sup>
<b>β-merkптоethanol</b>	2 mmol·dm <sup>-3</sup>
<b>glycerol</b>	10% (w/v)

Do výsledného objemu doplněno deionizovanou vodou.

**Tabulka 5.5** – složení elučního pufru

Složka	Výsledná koncentrace
<b>1 mol·dm<sup>-3</sup> Tris-HCl (pH = 7,5)</b>	20 mmol·dm <sup>-3</sup>
<b>NaCl</b>	1 mol·dm <sup>-3</sup>
<b>0,5 mol·dm<sup>-3</sup> EDTA (pH = 8,0)</b>	1 mmol·dm <sup>-3</sup>
<b>β-merkптоethanol</b>	2 mmol·dm <sup>-3</sup>
<b>glycerol</b>	10% (w/v)

Do výsledného objemu doplněno deionizovanou vodou.

#### 5.2.4. Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie je separační metoda, při níž dochází k dělení složek směsi dle jejich tvaru a velikosti. Stacionární fázi tvoří porézní gel na bázi polysacharidů nebo polyakrylamidu. Mobilní fáze obsahuje dělené látky rozpuštěné v pufru. Principem metody je, že molekuly s malou molekulovou hmotností difundují do pórů gelu, čímž jsou na koloně zadržovány. Oproti tomu molekuly s velkou molekulovou hmotností jsou příliš velké na to, aby difundovaly do pórů, a tak prochází kolonou bez zadržení a jsou eluovány dříve než menší molekuly.

## Provedení

Roztok proteinu z předešlého kroku byl převeden do centrifugační zkumavky s membránou (s propustností molekul menších než 10 kDa) a zkoncentrován centrifugací při 1400–1600×g a 4 °C na objem menší než 2 ml. Mezitím byla kolona HiLoad™ 26/600 Superdex™ 75 pg (o objemu 320 ml a maximálním vnitřním tlaku 0,3 MPa) připojena k ÄKTAprime pro FPLC a ekvilibrována pufr pro gelovou permeační chromatografii 1 (Tab. 5.6). Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1,5 ml/min. Pufr i roztok proteinu byly před použitím přefiltrovány přes filtry s pórovitostí 0,45 µm. Eluovaný protein byl jímán do plastových 1,5ml zkumavek, které byly poté uchovány na ledu. Přítomnost a čistota proteinu byla ověřena v 15% polyakrylamidovém gelu, který byl připraven metodou SDS-PAGE. Ve frakcích obsahující protein v dostatečném množství a čistotě byla změřena absorbance při 280 nm proti použitému pufru. Z hodnoty absorbance byla pomocí Lambertova-Beerova zákona vypočtena molární koncentrace a vzorky byly skladovány v –80 °C.

**Tabulka 5.6** – Složení pufru pro gelovou permeační chromatografii 1 (pH = 7,5)

Složka	Výsledná koncentrace
<b>Tris-HCl (pH = 7,5)</b>	20 mmol·dm <sup>-3</sup>
<b>0,5 mol·dm<sup>-3</sup> EDTA (pH = 8,0)</b>	1 mmol·dm <sup>-3</sup>
<b>DTT</b>	2 mmol·dm <sup>-3</sup>
<b>NaCl</b>	100 mmol·dm <sup>-3</sup>
<b>glycerol</b>	10% (w/v)

Do výsledného objemu doplněno deionizovanou vodou.

## 5.3. Purifikace transaktivační domény proteinu p53

### 5.3.1. GST afinitní chromatografie

Glutathion-S-transferasa (GST) je 211 aminokyselinových zbytků dlouhý enzym, který se hojně využívá jako afinitní značka. Jeho substrátem je redukovaný glutathion, jež se pro potřeby purifikace proteinů imobilizuje na pevný nosič. Proteiny se exprimují ve fúzi s GST afinitní kotvou, která se při průchodu kolonou naváže na imobilizovaný glutathion, čímž dojde k oddělení proteinu od zbytku buněčné směsi. K eluci se následně využívá roztok redukovaného glutathionu.

#### Provedení

Při purifikaci transaktivační domény proteinu p53 pomocí GST afinitní chromatografie byla použita kolona obsahující 5 ml sepharosy (Glutathion Sepharose Fast Flow). Nejdříve byl připraven GST pufr pro afinitní chromatografii (Tab. 5.7, str. 44). Poté byla kolona připojena k peristaltické pumpě a promyta dle následujícího postupu: 15 ml deionizované vody a 20 ml GST pufru pro afinitní chromatografii. Po promytí byla sepharosa z kolony vyjmuta a přesunuta do skleněné kádinky, v níž byla za stálého míchání inkubována s buněčným extraktem při 4 °C po dobu 40 minut. Po uplynutí doby inkubace byla kolona umístěna na led a za nízké průtokové rychlosti byl přidáván buněčný extrakt s matricí. Následovalo promývání 300 ml GST pufru pro afinitní chromatografii. Běžně se po promývacím kroku přistupuje k eluci fúzního proteinu a až poté ke štěpení afinitní značky, ale dle zkušeností z naší laboratoře se více osvědčilo odštěpovat protein od GST afinitní značky ve chvíli, kdy je navázaná na sepharose, neboť jediné tak lze efektivně dosáhnout jejího oddělení. Proto byla po promývání sepharosa s navázaným fúzním proteinem vyjmuta z kolony a přesunuta do malé skleněné kádinky, do níž byla přidána PreScission proteasa (pro štěpení fúzního proteinu získaného zpracováním šesti litrů buněčné kultury bylo použito 100 µl PreScission proteasy o koncentraci 3030 U/ml). Inkubace probíhala za stálého míchání dvě hodiny při 4 °C. Poté bylo pomocí metody SDS-PAGE ověřeno odštěpení GST afinitní značky. Obsah kádinky byl nanesen zpět na kolonu a bylo přidáno ještě 15 ml GST pufru pro afinitní chromatografii. Eluát byl jímán do plastových mikrozkuhavek umístěných na ledu. Kolona byla poté regenerována vymývacím pufrům (Tab. 5.8, str. 44). Díky tomu došlo k odstranění GST afinitní kotvy navázané na sepharose.

**Tabulka 5.7** – Složení GST pufru pro afinitní chromatografii (pH = 7,5)

Složka	Výsledná koncentrace
<b>Tris-HCl (pH = 7,5)</b>	20 mmol·dm <sup>-3</sup>
<b>0,5 mol·dm<sup>-3</sup> EDTA</b>	1 mmol·dm <sup>-3</sup>
<b>DTT</b>	10 mmol·dm <sup>-3</sup>
<b>NaCl</b>	500 mmol·dm <sup>-3</sup>
<b>glycerol</b>	10% (w/v)

Do výsledného objemu doplněno deionizovanou vodou.

**Tabulka 5.8** – Složení vymývacího pufru (pH = 8,0)

Složka	Výsledná koncentrace
<b>glutathion</b>	10 mmol·dm <sup>-3</sup>

Do výsledného objemu doplněno GST pufrům pro afinitní chromatografii, jehož složení je uvedeno v Tab. 5.7. Hodnota pH byla upravena na 8,0.

### 5.3.2. Dialýza

Princip dialýzy je vysvětlen v kapitole 5.2.2. na str. 39.

#### Provedení

Roztok proteinu získaný předchozím krokem byl převeden do dialyzační membrány s propustností molekul menších než 6-8 kDa a dialyzován přes noc při 4 °C ve 2 l pufru pro aniontově výměnnou chromatografii (Tab. 5.9, str. 45).

### 5.3.3. Aniontově výměnná chromatografie

Aniontově výměnná chromatografie je metoda, jejíž podstatou jsou elektrostatické interakce. Stacionární fází je iontoměnič, v tomto případě anex, což je matrice obsahující bazické funkční skupiny, které při styku s vodnou mobilní fází disociují. Při aniontové výměně dochází k uvolnění záporně nabitých iontů stacionární fáze a k jejich nahrazení záporně nabitými ionty

z roztoku. Během tohoto procesu má zásadní vliv jednak povaha stacionární fáze a také pH a iontová síla mobilní fáze. Pro oddělení žádoucího proteinu ze směsi je třeba zajistit, aby byl ve formě aniontu. Toho je dosaženo použitím pufru, jehož pH je vyšší než pI proteinu, což je hodnota pH, při níž je celkový náboj proteinu roven nule.

### Provedení

Teoretická hodnota pI TAD proteinu p53 (po odštěpení GST afinitní kotvy) získaná pomocí nástroje ProtParam tool je 3,47. Proto byl pro aniontově výměnnou chromatografii zvolen pufr s pH rovno 8,0. Složení pufru pro aniontově výměnnou chromatografii je uvedeno v Tab. 5.9. Chromatografie byla provedena na koloně naplněné Mono-Q Sepharosou, která byla připojena k ÄKTAprime pro FPLC. Roztok proteinu byl vyjmut z dialyzační membrány a přefiltrován přes filtr s pórovitostí 0,45  $\mu\text{m}$ . Stejným způsobem byly filtrovány i všechny použité pufrы. Rychlost průtoku mobilní fáze činila 1 ml/min. Eluce proteinu bylo docíleno gradientem iontové síly pomocí elučního pufru s vysokou koncentrací chloridu sodného (Tab. 5.10). Přítomnost proteinu v jednotlivých frakcích byla ověřena metodou SDS-PAGE.

**Tabulka 5.9** – Složení pufru pro aniontově výměnnou chromatografii (pH = 8,0)

Složka	Výsledná koncentrace
<b>Tris-HCl (pH = 8,0)</b>	50 mmol·dm <sup>-3</sup>
<b>0,5 mol·dm<sup>-3</sup> EDTA (pH = 8,0)</b>	1 mmol·dm <sup>-3</sup>
<b>DTT</b>	1 mmol·dm <sup>-3</sup>

Do výsledného objemu doplněno deionizovanou vodou.

**Tabulka 5.10** – Složení elučního pufru pro aniontově výměnnou chromatografii

Složka	Výsledná koncentrace
<b>Tris-HCl (pH = 8,0)</b>	50 mmol·dm <sup>-3</sup>
<b>0,5 mol·dm<sup>-3</sup> EDTA (pH = 8,0)</b>	1 mmol·dm <sup>-3</sup>
<b>DTT</b>	1 mmol·dm <sup>-3</sup>
<b>NaCl</b>	1 mol·dm <sup>-3</sup>

Do výsledného objemu doplněno deionizovanou vodou.

### 5.3.4. Gelová permeační chromatografie

Princip gelové permeační chromatografie vysvětlen v kapitole 5.2.4. na str. 41.

#### Provedení

Roztok proteinu byl převeden do centrifugační zkumavky s membránou (s propustností molekul menších než 5 kDa) a zkoncentrován centrifugací při  $1500\times g$  a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  na objem menší než 2 ml. Mezitím byla kolona HiLoad<sup>TM</sup> 26/600 Superdex<sup>TM</sup> 75 pg (o objemu 320 ml a maximálním vnitřním tlaku 0,3 MPa) připojena k ÄKTAprime pro FPLC a ekvilibrována pufrům pro gelovou permeační chromatografii 2 (Tab. 5.11). Rychlost průtoku mobilní fáze byla nastavena na 1,5 ml/min. Roztok proteinu byl, stejně jako použitý pufr, před použitím přefiltrován přes filtr s pórovitostí 0,45  $\mu\text{m}$ . Eluovaný protein byl uchován na ledu. Přítomnost a čistota proteinu byla ověřena v 15% polyakrylamidovém gelu, který byl připraven metodou SDS-PAGE. Ve frakcích obsahující protein v dostatečném množství a čistotě byla změřena absorbance při 280 nm proti použitému pufru. Z hodnoty absorbance byla pomocí Lambertova-Beerova zákona vypočtena molární koncentrace a vzorky byly zamrazeny a skladovány v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Tabulka 5.11** – Složení pufru pro gelovou permeační chromatografii 2 (pH = 7,5)

Složka	Výsledná koncentrace
<b>Tris-HCl (pH = 7,5)</b>	25 mmol·dm <sup>-3</sup>
<b>0,5 mol·dm<sup>-3</sup> EDTA (pH = 8,0)</b>	1 mmol·dm <sup>-3</sup>
<b>DTT</b>	1 mmol·dm <sup>-3</sup>
<b>NaCl</b>	150 mmol·dm <sup>-3</sup>
<b>glycerol</b>	10% (w/v)

Do výsledného objemu doplněno deionizovanou vodou.

### 5.3.5. SDS-PAGE

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE, z angl. sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) je elektroforetická metoda, která se využívá k separaci proteinů dle jejich velikosti na základě rozdílné migrace polyakrylamidovým gelem v elektrickém poli. Elektroforetická pohyblivost proteinů je závislá především na náboji a délce polypeptidového řetězce. Krom toho však závisí i na stupni denaturace. Dodecyl síran sodný (SDS) je aniontovým detergentem, který zajišťuje denaturaci proteinu a uděluje mu záporný náboj rovnoměrně na jednotku hmoty. Tím se překryje vlastní náboj proteinu a všechny proteiny putují v elektrickém poli směrem k anodě. Polyakrylamidový gel funguje na principu molekulového síta. Velikost pórů v gelu je dána poměrem použitého akrylamidu a bisakrylamidu. Proteiny o malé molekulové hmotnosti putují skrz póry v gelu snáz než ty s velkou molekulovou hmotností. Proto doputují za stejný čas do větší vzdálenosti od startu migrace. Kombinované použití SDS a polyakrylamidového gelu umožňuje eliminovat vliv struktury a náboje a proteiny jsou tak separovány jen na základě své molekulové hmotnosti.

Metoda SDS-PAGE byla v rámci této práce využívána pro kontrolu přítomnosti a čistoty purifikovaných proteinů. Pro analýzu všech FOXO proteinů i proteinu p53 byl vždy využíván 15% (v/v) separační a 5% (v/v) zaváděcí gel a standard Black Protein Ladder (Central European Biosystems s.r.o.) obsahující proteinové fragmenty o velikosti 11-245 kDa.

### Provedení

Vzorky pro SDS-PAGE byly vždy připravovány smícháním 15  $\mu$ l roztoku proteinu a 5  $\mu$ l 5 $\times$ SDS vzorkového pufru (Tab. 5.12, str. 48). Aby bylo docíleno úplné denaturace proteinu, byly vzorky 5 minut inkubovány při 95 °C. Poté bylo z každého vzorku odebráno 15  $\mu$ l a nanášeno do jamek zaváděcího gelu. Do jedné z prázdných jamek byly nanášeny 3  $\mu$ l standardu. Elektroforéza byla provedena v pufru pro elektroforézu (Tab. 5.13, str. 48) za stálého napětí 200 V a její průběh trval 60 minut. Složení 15% (v/v) separačního a 5% (v/v) zaváděcího gelu je uvedeno v Tab. 5.14 na str. 48 a pufr pro jejich přípravu v Tab. 5.15, obojí na str. 49. Proteiny v gelu byly poté vizualizovány pomocí roztoku barviva Coomassie Brilliant Blue R 250 (Tab. 5.16, str. 49). Gel byl nejprve povařen v 200 ml destilované vody a následně v barvicím roztoku. Po dosažení bodu varu byl gel ponechán 5 minut obarvit. Následovalo odbarvení povařením gelu v destilované vodě.

**Tabulka 5.12** – Složení 5×SDS vzorkového pufru

Složka	Odměřený objem [ml]
<b>1 mol·dm<sup>-3</sup> Tris-HCl (pH = 6,8)</b>	0,6
<b>50% (w/v) glycerol</b>	5,0
<b>10% (w/v) SDS</b>	2,0
<b>β-merkптоethanol</b>	0,5
<b>1% (w/v) bromfenolová modř</b>	1,0
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	0,9

**Tabulka 5.13** – Složení pufru pro elektroforézu

Složka	Hmotnost [g]
<b>Tris</b>	30
<b>glycin</b>	144
<b>SDS</b>	10

Doplněno deionizovanou vodou do 1 l.

**Tabulka 5.14** – Složení 15% (v/v) separačního a 5% (v/v) zaváděcího gelu

15% (v/v) Separační gel		5% (v/v) Zaváděcí gel	
Složka	Odměřený objem [ml]	Složka	Odměřený objem [ml]
<b>Pufr pro separační gel</b>	2,00	<b>Pufr pro zaváděcí gel</b>	1,00
<b>Rotiphorese Gel 30</b>	3,75	<b>Rotiphorese Gel 30</b>	0,50
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	1,75	<b>dH<sub>2</sub>O</b>	2,25
<b>10% (w/v) APS</b>	45·10 <sup>-3</sup>	<b>10% (w/v) APS</b>	45·10 <sup>-3</sup>
<b>TEMED</b>	5·10 <sup>-3</sup>	<b>TEMED</b>	5·10 <sup>-3</sup>

**Tabulka 5.15** – Složení pufrů pro přípravu separačního a zaváděcího gelu

Pufr pro separační gel		Pufr pro zaváděcí gel	
Složka	Odměřený objem [ml]	Složka	Odměřený objem [ml]
<b>2 M Tris-HCl (pH = 8,8)</b>	75	<b>1 M Tris-HCl (pH = 6,8)</b>	50
<b>10% (w/v) SDS</b>	4,0	<b>10% (w/v) SDS</b>	4,0
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	21	<b>dH<sub>2</sub>O</b>	46

**Tabulka 5.16** – Složení roztoku barvicího roztoku pro vizualizaci gelů

Složka	Odměřené množství
<b>CBB G-250</b>	80 mg
<b>35% HCl</b>	3 ml

Doplněno deionizovanou vodou do 1 l.

## 5.4. Měření stacionární anisotropie fluorescence

Fluorescence je spinově dovoleným přechodem atomu či molekuly většinou ze základní vibrační hladiny energeticky vyššího stavu  $S_1$  do některé z vibračních hladin základního stavu  $S_0$ . Do excitovaného stavu se částice dostane absorpcí světelného záření či chemickou reakcí. K deexcitaci následně dochází buď zářivými či nezářivými přechody. Fluorescence je příkladem zářivého přechodu, jež má dobu života excitovaného stavu řádově  $10^{-8}$  s.

V případě, že systém ozáříme lineárně polarizovaným světlem (což je elektromagnetické záření, jehož vektor intenzity elektrického pole osciluje v jedné rovině), dojde k absorpci světla pouze těmi molekulami, jejichž přechodný absorpční dipólový moment je orientován rovnoběžně s rovinou polarizace excitačního záření. Budou tedy excitovány pouze ty molekuly, které jsou vůči excitačnímu záření vhodně orientovány. Tomuto jevu se říká fotoselekce. Pokud by nedocházelo k rotaci molekul v roztoku (např. ve zmraženém vzorku), emitované záření by bylo rovněž polarizované. Avšak za běžných podmínek molekuly v roztoku vykonávají rotační difuzi a v důsledku toho je emitované záření depolarizované. Míra depolarizace záření je kvantifikována veličinou anisotropie fluorescence. Čím rychleji daná molekula rotuje, tím je míra depolarizace vyšší. Proto lze tuto metodu využít ke studiu protein-proteinových interakcí, neboť vzniklý proteinový komplex rotuje pomaleji než proteiny samotné. Anisotropie fluorescence ( $r_s$ ) je definována hodnotou intenzity fluorescence naměřené ve vertikální a horizontální rovině vzhledem k celkové intenzitě záření dle vztahu:

$$r_s = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

kde  $I_{\parallel}$  je intenzita záření, jež bylo emitováno horizontálně vzhledem k rovině polarizace excitačního záření a  $I_{\perp}$  je intenzita záření, jež bylo emitováno vertikálně vzhledem k rovině polarizace excitačního záření.

Na rychlost rotace molekul má krom jejich efektivního molekulového objemu vliv také viskozita prostředí a teplota. Nejvyšší hodnotu anisotropie lze naměřit při velmi nízké teplotě v roztoku s velkou viskozitou.

## Provedení

Před samotným měřením byly nejprve připraveny dvě dvouvláknové fluoresceinem značené DNA (IRE a DBE), které jsou rozpoznávány všemi FOXO proteiny. Pro hybridizaci byly použity jednovláknové oligonukleotidy, jejichž sekvence jsou uvedeny níže:

**F1c-IRE-up:** 5'-GACTATCAAACAACGC-3'

**IRE-down:** 5'-GCGTTGTTTTGATAGTC-3'

**F1c-DBE-up:** 5'-GACTATGTAAACAACGC-3'

**DBE-down:** 5'-GCGTTGTTTACATAGTC-3'

Nukleotidy v lyofilizované formě byly rozpuštěny ve sterilní deionizované vodě. Roztoky nukleotidů byly naředěny na výslednou koncentraci  $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Následovala příprava dvou hybridizačních směsí. Každá z nich obsahovala dvojici komplementárních oligonukleotidů, přičemž jeden z nich byl na 5'-konci značen fluoresceinem. Složení hybridizační směsi a hybridizačního pufru shrnuje Tab. 5.17. Hybridizační směs byla následně po 50  $\mu\text{l}$  pipetována do plastových mikrozkušavek. Poté byla ve vodní lázni zahřáta na  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  a ponechána postupně vychladnout, čímž došlo ke vzniku dvouvláknové DNA.

**Tab. 5.17** – Složení pufru pro hybridizaci a složení hybridizační směsi

Pufr pro hybridizaci		Hybridizační směs	
Složka	Výsledná koncentrace [ $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]	Složka	Odměřený objem [ $\mu\text{l}$ ]
HEPES (pH = 7,5)	100	F1c-(IRE/DBE)-up	50
NaCl	500	(IRE/DBE)-down	50
EDTA (pH = 8,0)	10	Pufr pro hybridizaci	100
Doplněno sterilní deionizovanou vodou.		ddH <sub>2</sub> O	800

Hybridizační směsi byly připraveny dvě – jedna obsahovala oligonukleotidy F1c-IRE-up + IRE-down a druhá F1c-DBE-up + DBE-down.

Proteiny FOXO1-DBD, FOXO3-DBD, FOXO4-DBD a p53-TAD byly připraveny postupy uvedenými v předešlých kapitolách této práce. Den před samotným měřením byly všechny proteiny přes noc dialyzovány ve 2 l pufru A (Tab. 5.18) při 4 °C v dialyzačních membránách s propustností molekul menších než 6-8 kDa. Poté byly proteiny převedeny do centrifugačních zkumavek s membránou propouštějící molekuly menší než 10 kDa (pro všechny FOXO-DBD) a 5 kDa (pro p53-TAD). Následovala centrifugace při 1292×g a 4 °C. Roztoky proteinů byly naředěny HBS pufrém (Tab. 5.19). Výsledná koncentrace zásobních roztoků všech FOXO-DBD byla 10 μmol·dm<sup>-3</sup>. Zásobní roztok p53-TAD měl výslednou koncentraci 134 μmol·dm<sup>-3</sup>. V Tab. 5.19 je krom HBS pufru uveden i roztok 10×HBS použitý k jeho přípravě.

**Tab. 5.18** – Složení dialyzačního pufru A

Složka	Odměřené množství
<b>10×HBS (pH = 7,4)</b>	100 ml
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	900 ml
<b>TCEP</b>	0,287 g

Složení 10×HBS pufru je uvedeno v Tab. 5.19

**Tab. 5.19** – Složení roztoků 10×HBS (pH = 7,4) a HBS pufru

10×HBS (pH = 7,4)		HBS pufr	
Složka	Výsledná koncentrace [mol·dm <sup>-3</sup> ]	Složka	Výsledná koncentrace
<b>HEPES (pH = 7,5)</b>	0,1	<b>10×HBS (pH = 7,4)</b>	1×
<b>NaCl</b>	1,5	<b>Tween-20</b>	0,1% (v/v)
Oba roztoky doplněny sterilní deionizovanou vodou.		<b>BSA</b>	0,1% (w/v)

Roztoky dvouvláknových fluoresceinem značených DNA (Flc-dsIRE a Flc-dsDBE) byly následně zředěny HBS pufr. Ředěním byly získány roztoky obou DNA o koncentraci  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  a  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Poté bylo připraveno několik roztoků s obsahem FOXO-DBD pro měření stacionární anisotropie fluorescence. Pro každý FOXO-DBD (FOXO1-DBD, FOXO3-DBD, FOXO4-DBD) byly připraveny 3 roztoky (A1, B1, C1) dle Tab. 5.20. Celkem bylo tedy připraveno 9 roztoků s obsahem FOXO-DBD. Následovala příprava roztoků s obsahem značných dvouvláknových DNA (A2, B2, C2) dle Tab. 5.21 na str. 54.

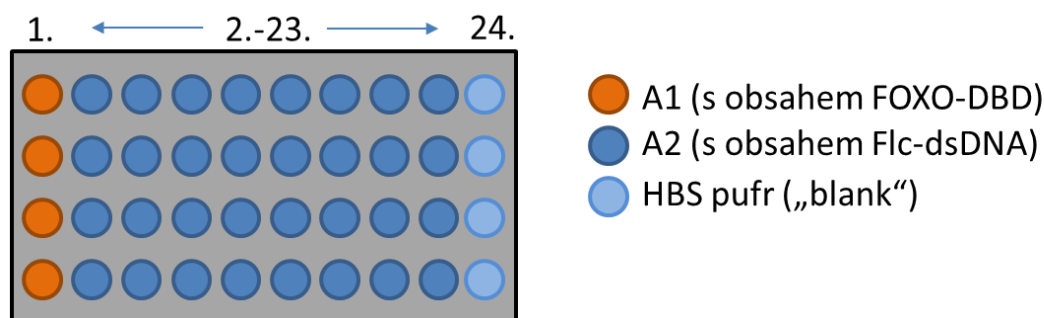
**Tab. 5.20** – Složení roztoků obsahujících FOXO-DBD pro měření stacionární anisotropie fluorescence

Roztok	Složka	Odměřený objem [ $\mu\text{l}$ ]
<b>A1</b>	FOXO-DBD ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )	40
	Flc-dsIRE ( $5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )	2
	HBS pufr	158
<b>B1</b>	FOXO-DBD ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )	40
	Flc-dsIRE ( $5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )	2
	p53-TAD ( $134 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )	59,8
	HBS pufr	98,2
<b>C1</b>	FOXO-DBD ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )	40
	Flc-dsDBE ( $5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )	2
	HBS pufr	158

**Tab. 5.21** – Složení roztoků s obsahem značných dvouvláknových DNA (Flc-dsIRE, Flc-dsDBE)

Roztok	Složka	Odměřený objem [ $\mu\text{l}$ ]
<b>A2</b>	Flc-dsIRE ( $50 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )	2
	HBS pufr	1998
<b>B2</b>	Flc-dsIRE ( $50 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )	2
	p53-TAD ( $134 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )	597
	HBS pufr	1401
<b>C2</b>	Flc-dsDBE ( $50 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )	2
	HBS pufr	1998

Měření stacionární anisotropie fluorescence probíhalo v kvadruplikátech v destičkách Corning® 384 Round Bottom Black Polystyrene. Do první jamky řádku byl vždy pipetován jeden z roztoků obsahující protein (dle Tab. 5.20, str. 53) o objemu  $40 \mu\text{l}$ . Do poslední 24. jamky každého řádku destičky bylo pipetováno  $20 \mu\text{l}$  HBS pufru (Tab. 5.19, str. 52), který sloužil jako slepý vzorek („blank“). Do jamek 2.-23. bylo pipetováno  $20 \mu\text{l}$  roztoku s obsahem značené dvouvláknové DNA (Tab. 5.21), přičemž tento roztok je označen shodným písmenem jako roztok proteinu v 1. jamce. Pokud byl tedy do 1. jamky pipetován například roztok A1, do jamek 2.-23. byl pipetován roztok A2 (Obr. 5.1).



**Obr. 5.1** – Schéma pipetování roztoků pro měření stacionární anisotropie fluorescence. Čísla 1-24 označují pořadí dané jamky v rámci řádku.

Následně bylo z první jamky odebráno 20  $\mu\text{l}$  a přeneseno do druhé jamky. Obsah jamky byl opatrně promíchán a stejný objem byl poté přenesen do následující jamky. Tento postup byl opakován až do 22. jamky, čímž bylo docíleno poklesu koncentrace FOXO-DBD v jamkách 1.-22. dvojkovou ředící řadou. Následovalo měření pomocí přístroje CLARIOstar<sup>®</sup> od firmy BMG labtech při vlnové délce excitace 480 nm a vlnové délce emise 530 nm.

### Vyhodnocení získaných dat

Měření bylo provedeno pomocí přístroje CLARIOstar<sup>®</sup>, k němuž byl dodán také stejnojmenný software CLARIOstar. Pomocí tohoto softwaru byla získána hodnota anisotropie fluorescence jednotlivých vzorků ( $r_s$ ). Od této hodnoty byla následně odečtena nejnižší hodnota anisotropie fluorescence ( $r_s$ )<sub>0</sub> naměřená pro fluorescenčně značenou dvouvláknovou DNA v jamce bez přítomnosti FOXO-DBD. Tím byla získána hodnota změny anisotropie fluorescence ( $\Delta r_s$ ) pro dvouvláknovou DNA v přítomnosti FOXO-DBD.

Pro hodnoty ( $\Delta r_s$ ) získané čtyřmi či osmi měřeními s použitím DNA DBE či IRE (v tomto pořadí) byl poté vypočítán aritmetický průměr a ten byl pomocí programu GraphPad Prism 8.0.1 vynesena v závislosti na koncentraci FOXO-DBD. Tato závislost byla následně proložena rovnicí 5.1, čímž byly získány hodnoty  $K_D$  a ( $\Delta r_s$ )<sub>max</sub>:

$$\Delta r_s = \frac{(\Delta r_s)_{max} \cdot [\text{FOXO}]}{K_D + [\text{FOXO}]} \quad [5.1]$$

kde ( $\Delta r_s$ )<sub>max</sub> značí maximální hodnotu změny stacionární anisotropie fluorescence při saturační koncentraci ligandu, [FOXO] značí molární koncentraci FOXO-DBD a  $K_D$  disociační konstantu.

## 6. Výsledky

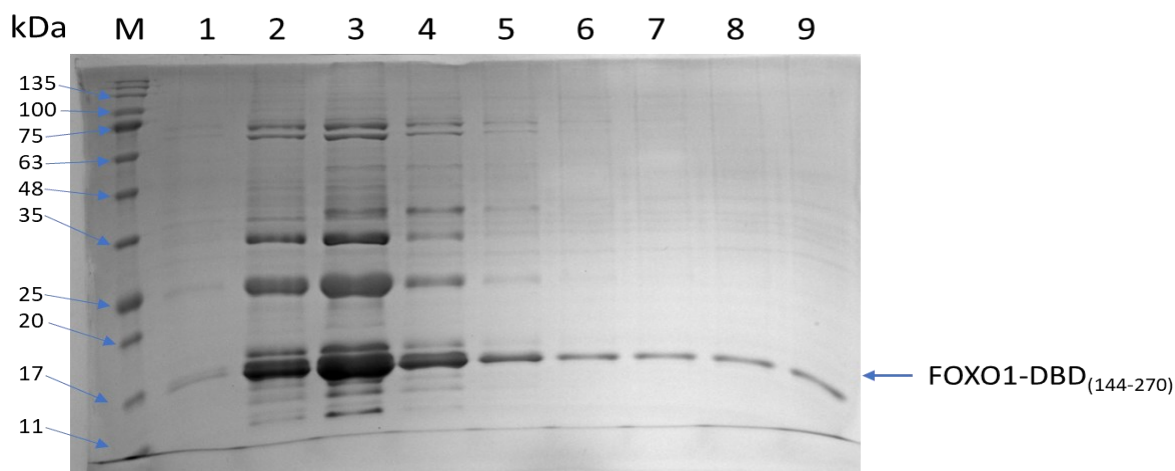
V první části této kapitoly jsou prezentovány výsledky purifikací jednotlivých FOXO-DBD a p53-TAD. V druhé části jsou shrnuty výsledky měření vazebných afinit připravených FOXO-DBD ke dvěma konsenzuálním sekvencím v přítomnosti i nepřítomnosti p53-TAD. Všechny tři konstrukty FOXO-DBD byly navrženy tak, aby měly jejich N- a C-koncové sekvence stejnou délku. Oba konce se totiž účastní vazby k DNA a případné rozdíly v délce by mohly značně zkreslovat výsledky měření. Zkrácení koncových sekvencí se však promítlo v náročnosti přípravy takto navržených proteinů. Pro expresi proteinů bylo zapotřebí používat velké objemy LB média a následné purifikace bylo nutné, vzhledem k poměrně nízkým výtěžkům, mnohokrát opakovat.

### 6.1. Purifikace proteinu FOXO1<sub>(144-270)</sub>

Purifikace DNA-vazebné domény transkripčního faktoru FOXO1<sub>(144-270)</sub> zahrnovala následující kroky: niklovou chelatační chromatografií, heparinovou afinitní chromatografií a gelovou permeační chromatografií. Přítomnost a čistota produktu byla po každém tomto kroku ověřena metodou SDS PAGE (kap. 5.3.5, str. 47). Výtěžek činil celkem 18 mg proteinu z 20 l bakteriální kultury.

#### 6.1.1. Niklová chelatační chromatografie

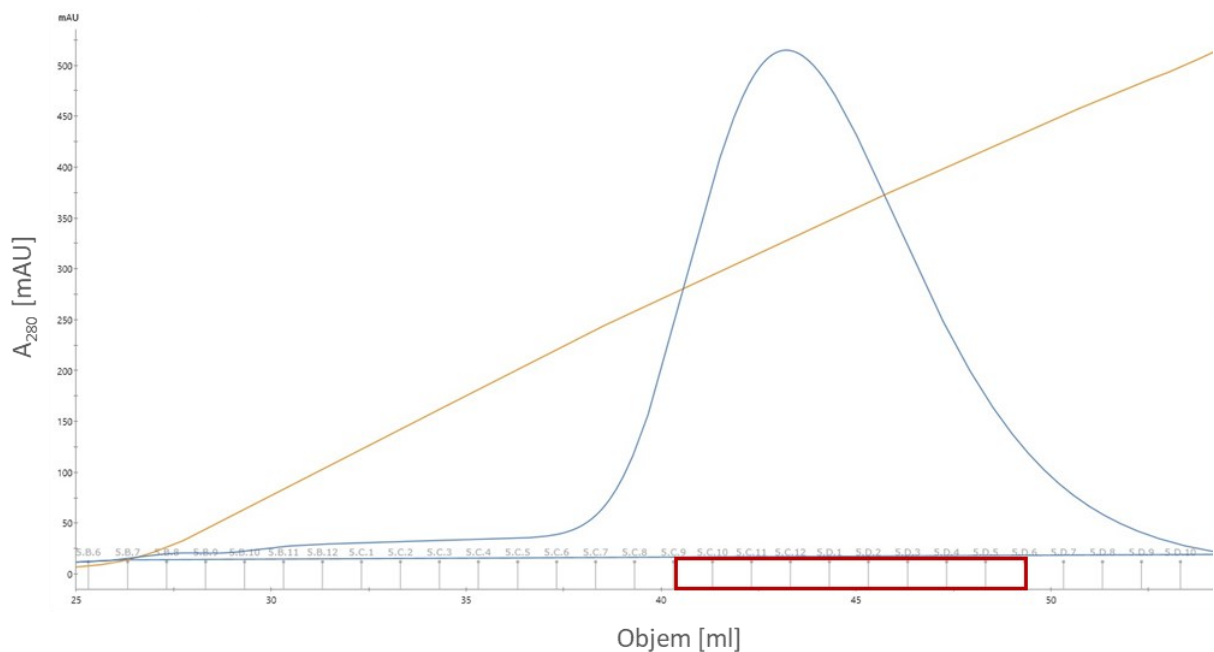
Protein FOXO1-DBD byl exprimován ve fúzi s histidinovou kotvou, která byla využita k provedení niklové chelatační chromatografie. Eluce proteinu bylo docíleno promytím kolony 15 ml pufru s koncentrací imidazolu odpovídající  $0,4 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Získaný roztok byl uchován na ledu v plastových mikrozkuřkách po 1,5 ml. Následně byla metodou SDS-PAGE pomocí 15% (v/v) polyakrylamidového gelu ověřena přítomnost a čistota FOXO1-DBD v jednotlivých frakcích. Z gelu na Obr. 6.1. na str. 57 je patrné, že se protein FOXO1-DBD exprimoval v dostatečném množství. Zřetelně jsou však vidět také redundantní proteiny, proto se přistoupilo k následujícímu purifikačnímu kroku. Vybrané frakce (2-9) byly sjednoceny a dialyzovány s TEV proteasou pro odštěpení histidinové kotvy.



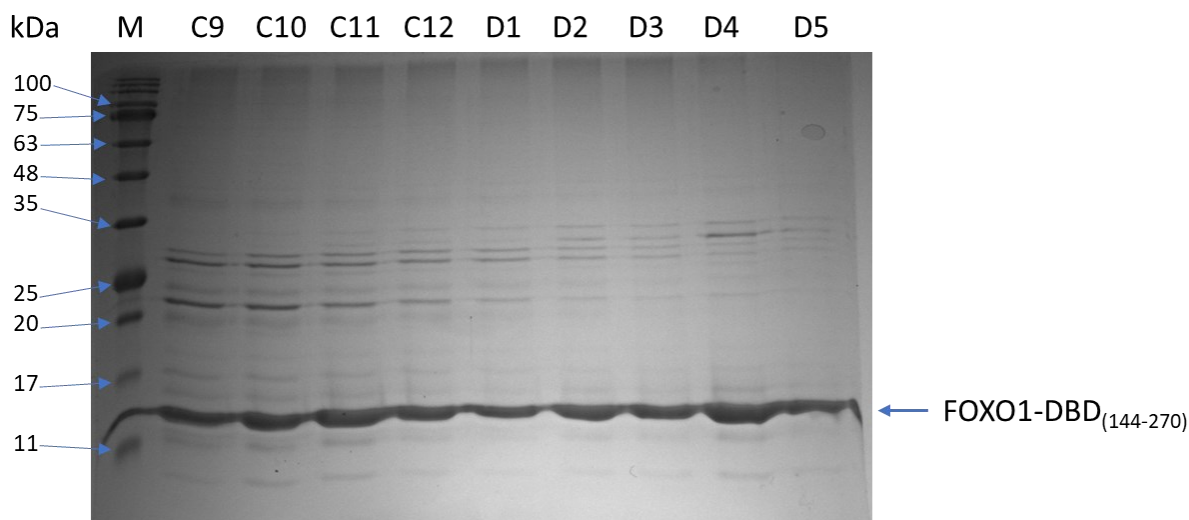
**Obr. 6.1** – Vizualizace 15% (v/v) polyakrylamidového gelu získaného metodou SDS-PAGE po niklové chelatační chromatografii FOXO1-DBD. První jamka obsahovala 3  $\mu$ l standardu molekulových hmotností Black Protein Ladder (Central European Biosystems s.r.o.), který je na obrázku označen jako M. Zbylé jamky obsahovaly roztok proteinu FOXO1-DBD vzniklý smícháním 15  $\mu$ l roztoku dané frakce (2-9) a 5  $\mu$ l 5 $\times$ SDS-vzorkového pufru. Vybrané frakce byly poté sjednoceny a dialyzovány s TEV proteasou pro odštěpení histidinové kotvy.

### 6.1.2. Heparinová afinitní chromatografie

Následujícím purifikačním krokem byla heparinová afinitní chromatografie. Ta byla provedena na koloně HiTrap™ Heparin HP připojené k ÄKTAprime pro FPLC. Protein FOXO1-DBD byl eluován gradientem koncentrace chloridu sodného. Objem jímaných frakcí činil 1 ml a mikrozkušavky byly po celou dobu uchovávány na ledu. Záznam průběhu této chromatografie je zobrazen na Obr. 6.2 na str. 58. Čistota frakcí označených červeným rámečkem byla následně charakterizována pomocí 15% (v/v) polyakrylamidového gelu metodou SDS-PAGE (Obr. 6.3, str. 58). Z obrázku gelu je zřetelně vidět, že se podařilo oddělit převážnou část kontaminujících proteinů. Čistota produktu byla ale přesto pro potřeby měření anisotropie fluorescence nedostačující, a tak se přistoupilo k provedení gelové permeační chromatografie.



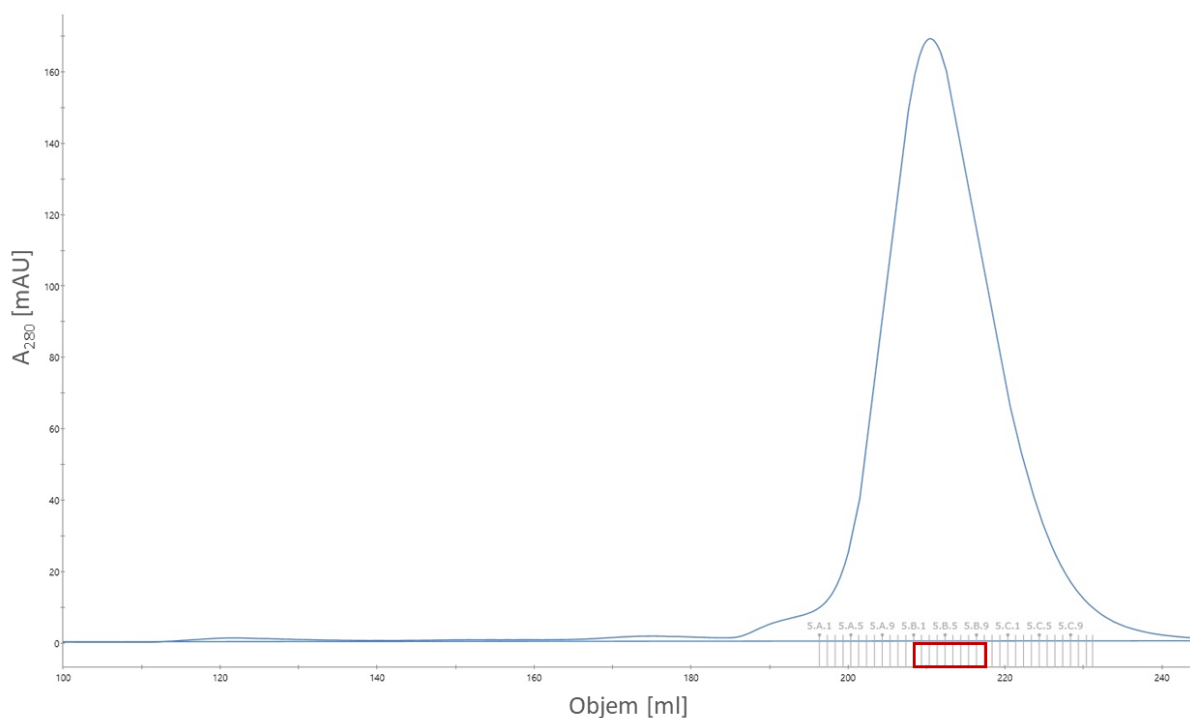
**Obr. 6.2** – Záznam průběhu heparinové afinitní chromatografie FOXO1-DBD. Oranžově je znázorněna křivka závislosti konduktivity na objemu mobilní fáze a modře je závislost absorbance při vlnové délce 280 nm na objemu mobilní fáze. Frakce označené červeným rámečkem byly vybrány pro analýzu metodou SDS-PAGE v 15% (v/v) polyakrylamidovém gelu.



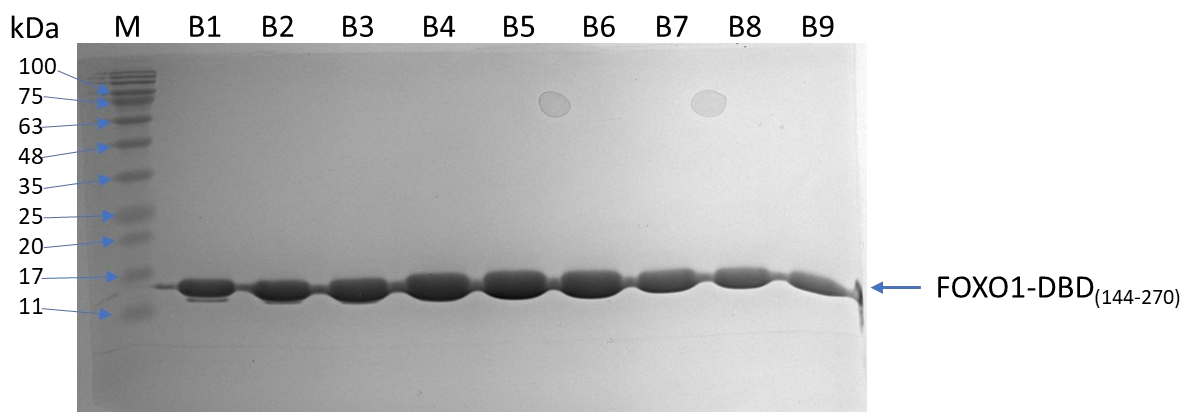
**Obr. 6.3** – Vizualizace 15% (v/v) polyakrylamidového gelu získaného metodou SDS-PAGE po heparinové afinitní chromatografii FOXO1-DBD. První jamka obsahovala 3  $\mu$ l standardu molekulových hmotností Black Protein Ladder (Central European Biosystems s.r.o.), který je na obrázku označen jako M. Zbylé jamky obsahovaly roztok proteinu FOXO1-DBD vzniklý smícháním 15  $\mu$ l roztoku dané frakce a 5  $\mu$ l 5 $\times$ SDS-vzorkového pufru. Všechny frakce byly následně sjednoceny a uchovány na ledu pro další použití.

### 6.1.3. Gelová permeační chromatografie

Posledním purifikační krokem byla gelová permeační chromatografie. Byla provedena na koloně HiLoad Superdex 75 26/600 připojené k ÄKTAprime pro FPLC. Vzorokly byly před aplikací na kolonu zkoncentrovány ultrafiltrací na objem menší než 2 ml. Protein eluovaný z kolony byl jímán do plastových mikrozkuavek, které byly poté uchovány na ledu. Záznam průběhu chromatografie je zobrazen na Obr. 6.4. Čistota roztoku proteinu byla následně charakterizována metodou SDS-PAGE v 15% (v/v) polyakrylamidovém gelu (Obr. 6.5, str. 60). Z gelu je patrné, že bylo dosaženo dostatečné čistoty, neboť se podařilo oddělit všechny nežádoucí proteiny. Všechny frakce (B1-B9) byly spojeny, zamraženy a uchovány v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Obr. 6.4** – Záznam gelové permeační chromatografie FOXO1-DBD. Křivka znázorňuje závislost absorbance při vlnové délce 280 nm na objemu mobilní fáze. Červeným rámečkem jsou označeny frakce vybrané pro analýzu metodou SDS-PAGE v 15% (v/v) polyakrylamidovém gelu.



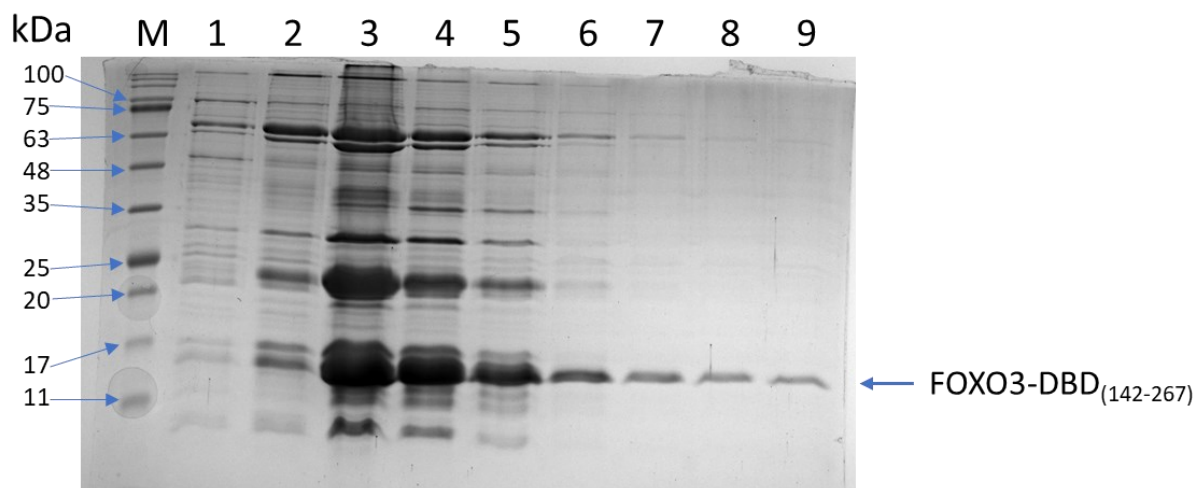
**Obr. 6.5** – Vizualizace 15% (v/v) polyakrylamidového gelu získaného metodou SDS-PAGE po gelové permeační chromatografii. První jamka obsahovala 3  $\mu$ l standardu molekulových hmotností Black Protein Ladder (Central European Biosystems s.r.o.), který je na obrázku označen jako M. Zbylé jamky obsahovaly roztok proteinu FOXO1-DBD vzniklý smícháním 15  $\mu$ l roztoku dané frakce a 5  $\mu$ l 5 $\times$ SDS-vzorkového pufru. Vybrané frakce (B1-B9) byly následně sjednoceny, zamrazeny a skladovány v  $-80$   $^{\circ}$ C.

## 6.2. Purifikace proteinu FOXO3<sub>(142-267)</sub>

Purifikace DNA-vazebné domény transkripčního faktoru FOXO3<sub>(142-267)</sub> byla téměř identická jako purifikace FOXO1<sub>(144-270)</sub> (viz výše). Purifikační kroky tvořila opět niklová chelatační chromatografie, heparinová afinitní chromatografie a gelová permeační chromatografie. Přítomnost a čistota produktu byla po každém tomto kroku ověřena metodou SDS PAGE (kap. 5.3.5, str. 47). Výtěžek činil celkem 8 mg proteinu z 26 l bakteriální kultury.

### 6.2.1. Niklová chelatační chromatografie

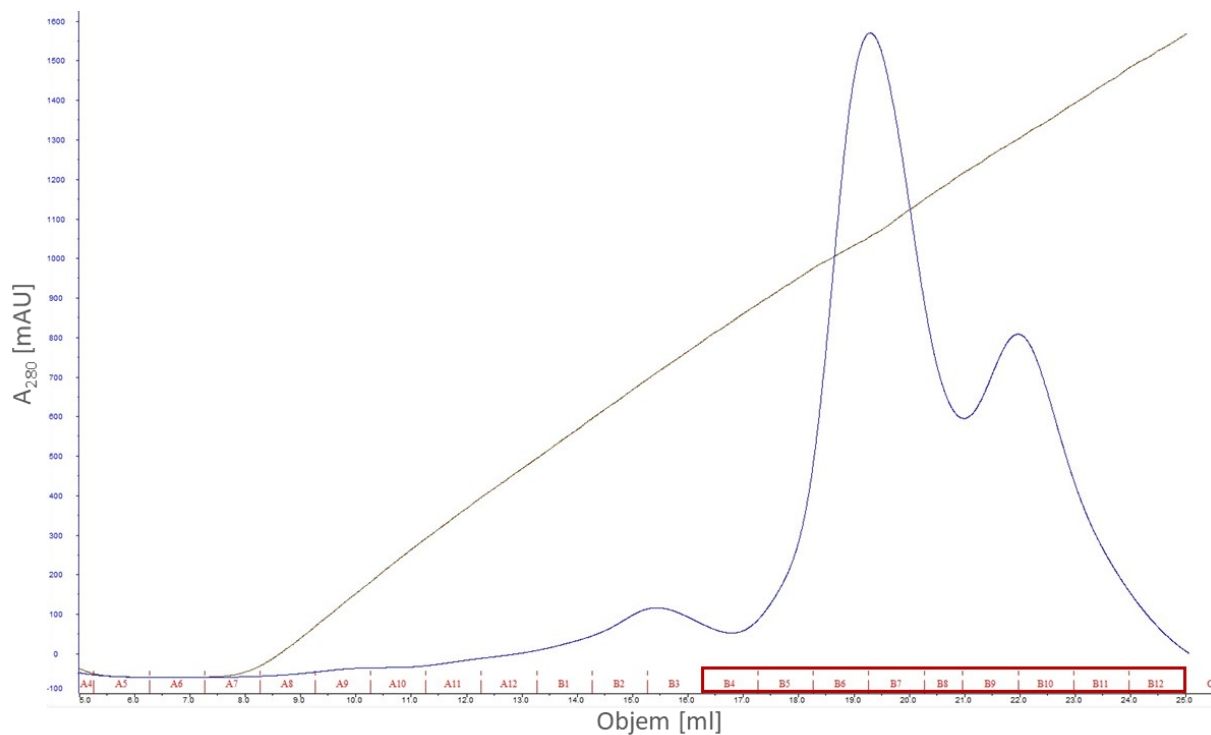
Protein FOXO3-DBD byl exprimován ve fúzi s histidinovou kotvou, což umožnilo provedení niklové chelatační chromatografie. Protein byl eluován 15 ml pufru s koncentrací imidazolu odpovídající  $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Získaný roztok proteinu byl uchován na ledu v plastových mikrozkušavkách po 1,5 ml. Čistota jednotlivých frakcí byla charakterizována metodou SDS-PAGE pomocí 15% (v/v) polyakrylamidového gelu. Z gelu na Obr. 6.6. na str. 61 lze vidět, že se protein FOXO3-DBD exprimoval v dostatečném množství. Ve vzorku je také přítomno poměrné množství nečistot. Vybrané frakce (3-9) byly sjednoceny a dialyzovány s TEV proteasou pro odštěpení histidinové kotvy.



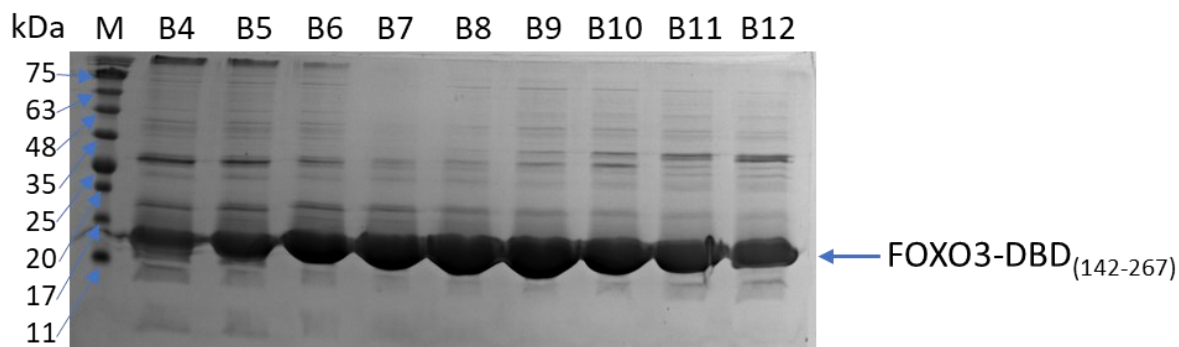
**Obr. 6.6** – Vizualizace 15% (v/v) polyakrylamidového gelu získaného metodou SDS-PAGE po niklové chelatační chromatografii FOXO3-DBD. První jamka obsahovala 3  $\mu$ l standardu molekulových hmotností Black Protein Ladder (Central European Biosystems s.r.o.), který je na obrázku označen jako M. Zbylé jamky obsahovaly roztok proteinu FOXO3-DBD vzniklý smícháním 15  $\mu$ l roztoku dané frakce a 5  $\mu$ l 5 $\times$ SDS-vzorkového pufru. Vybrané frakce byly poté sjednoceny a dialyzovány s TEV proteasou pro odštěpení histidinové kotvy.

### 6.2.2. Heparinová afinitní chromatografie

Dalším purifikačním krokem byla heparinová afinitní chromatografie provedená na koloně HiTrap™ Heparin HP. Eluce proteinu FOXO3-DBD bylo docíleno gradientem iontové síly. Objem každé frakce odpovídal 1 ml. Roztok proteinu byl uchován v plastových mikrozkuvkách, které byly umístěny na ledu. Průběh chromatografie je znázorněn na Obr. 6.7 na str. 62. Čistota frakcí označených červeným rámečkem byla následně charakterizována pomocí 15% (v/v) polyakrylamidového gelu metodou SDS-PAGE (Obr. 6.8, str. 62). Z obrázku gelu je patrné, že se podařilo snížit kontaminaci vzorku nečistotami. Stále jsou tu však viditelné proužky odpovídající proteinům s vyšší molekulovou vahou. Bylo proto zapotřebí přistoupit k dalšímu purifikačnímu kroku.



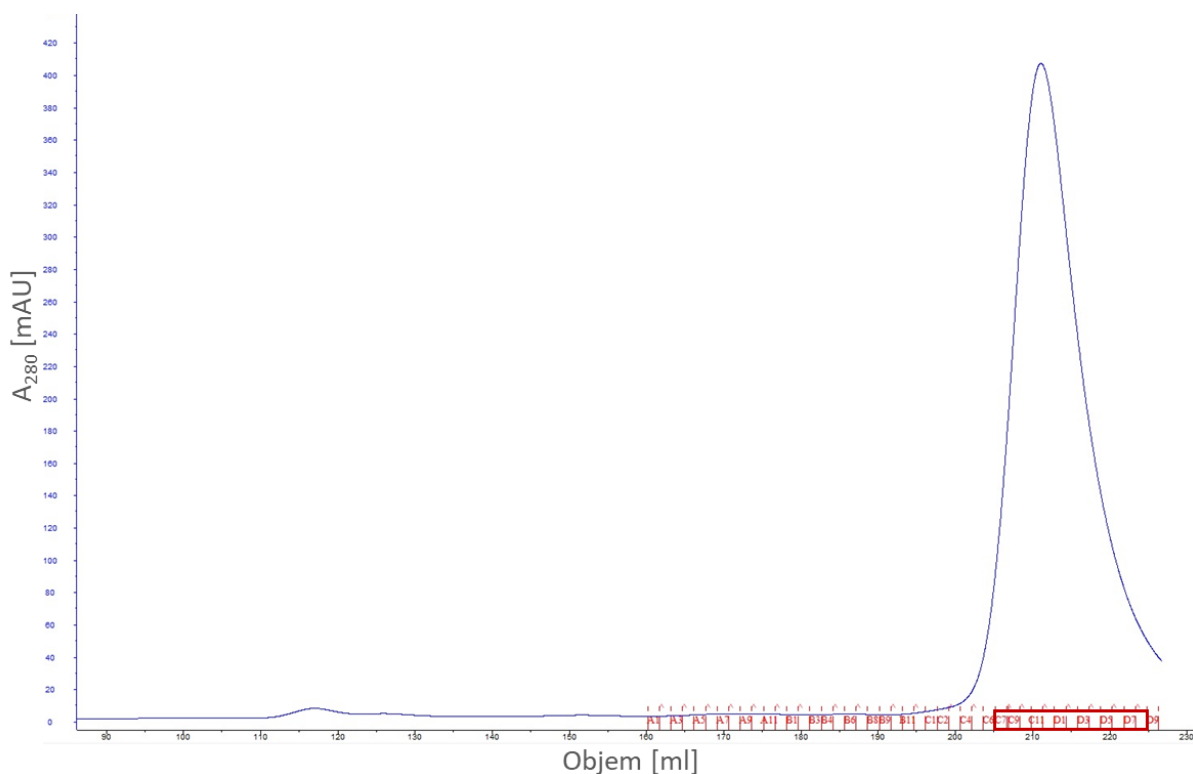
**Obr. 6.7** – Záznam heparinové afinitní chromatografie FOXO3-DBD. Černě je znázorněna křivka závislosti konduktivity na objemu mobilní fáze a modře je závislost absorbance při vlnové délce 280 nm na objemu mobilní fáze. Frakce označené červeným rámečkem byly vybrány pro analýzu metodou SDS-PAGE v 15% (v/v) polyakrylamidovém gelu.



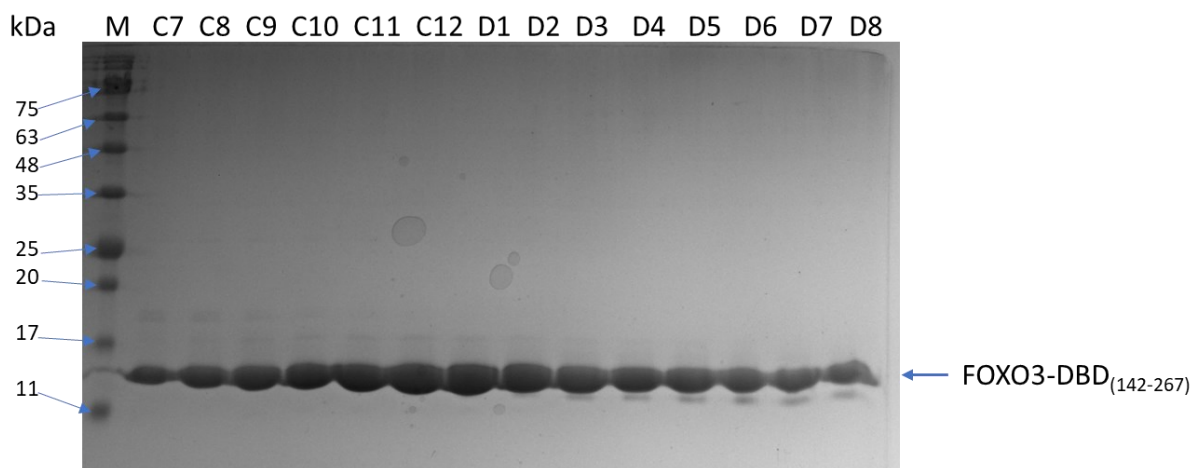
**Obr. 6.8** – Vizualizace 15% (v/v) polyakrylamidového gelu získaného metodou SDS-PAGE po heparinové afinitní chromatografii FOXO3-DBD. První jamka obsahovala 3  $\mu$ l standardu molekulových hmotností Black Protein Ladder (Central European Biosystems s.r.o.), který je na obrázku označen jako M. Zbylé jamky obsahovaly roztok proteinu FOXO3-DBD vzniklý smícháním 15  $\mu$ l roztoku dané frakce a 5  $\mu$ l 5 $\times$ SDS-vzorkového pufru. Vybrané frakce byly následně sjednoceny a zkoncentrovány.

### 6.2.3. Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie představovala poslední purifikační krok. Pro optimální separaci jednotlivých proteinů byla použita kolona HiLoad Superdex 75 26/600. Vzorky byly před nanesením na kolonu zkoncentrovány ultrafiltrací. Protein eluovaný z kolony byl jímán do plastových mikrozkuvek. Aby se předešlo degradaci proteinu, byly mikrozkuvky uchovávány na ledu. Záznam průběhu chromatografie shrnuje Obr. 6.9. Čistota produktu byla následně charakterizována pomocí 15% (v/v) polyakrylamidového gelu metodou SDS-PAGE (Obr. 6.10, str. 64). Z obrázku gelu lze soudit, že bylo dosaženo optimální čistoty. Ve frakcích D5-D8 je viditelný malý proužek odpovídající produktu degradace, proto byly tyto frakce zamrazeny zvlášť. Frakce C7-D4 byly spojeny, zamrazeny a uchovány v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro další použití.



**Obr. 6.9** – Záznam gelové permeační chromatografie FOXO3-DBD. Křivka znázorňuje závislost absorbance při vlnové délce 280 nm na objemu mobilní fáze. Červeným rámečkem jsou označeny frakce vybrané pro analýzu metodou SDS-PAGE v 15% (v/v) polyakrylamidovém gelu.



**Obr. 6.10** – Vizualizace 15% (v/v) polyakrylamidového gelu získaného metodou SDS-PAGE po gelové permeační chromatografii. První jamka obsahovala 3  $\mu$ l standardu molekulových hmotností Black Protein Ladder (Central European Biosystems s.r.o.), který je na obrázku označen jako M. Zbylé jamky obsahovaly roztok proteinu FOXO3-DBD vzniklý smícháním 15  $\mu$ l roztoku dané frakce a 5  $\mu$ l 5 $\times$ SDS-vzorkového pufru. Vybrané frakce byly následně sjednoceny, zamrazeny a skladovány v  $-80$   $^{\circ}$ C.

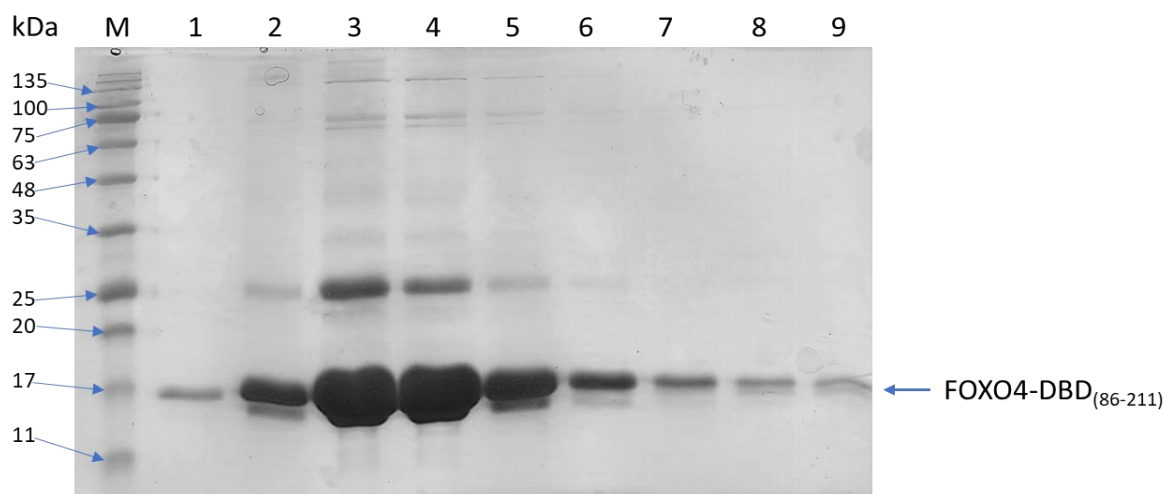
### 6.3. Purifikace proteinu FOXO4<sub>(86-211)</sub>

Posledním purifikovaným proteinem z FOXO podskupiny transkripčních faktorů byl protein FOXO4, konkrétně jeho DNA-vazebná doména (FOXO4-DBD<sub>(86-211)</sub>). Purifikační postup se skládal z různých chromatografických metod včetně niklové chelatační chromatografie, heparinové afinitní chromatografie a také gelové permeační chromatografie. Přítomnost a čistota produktu byla po každém tomto kroku charakterizována metodou SDS PAGE (kap. 5.3.5, str. 47). Výtěžek činil celkem 7 mg proteinu z 20 l bakteriální kultury.

#### 6.3.1. Niklová chelatační chromatografie

Protein FOXO4-DBD byl, stejně jako FOXO1-DBD a FOXO3-DBD, exprimován ve fúzi s histidinovou kotvou. Pomocí této afinitní značky došlo k zachycení FOXO4-DBD na koloně, zatímco převážná většina nečistot byla vymyta. Eluce proteinu bylo docíleno pomocí 15 ml pufru s koncentrací imidazolu odpovídající  $0,6 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Získaný roztok byl uchován na ledu v plastových mikrozkuvkách po 1,5 ml. Následně byla metodou SDS-PAGE pomocí 15% (v/v) polyakrylamidového gelu ověřena přítomnost a čistota FOXO4-DBD v jednotlivých frakcích. Z gelu na Obr. 6.11 na str. 65 lze vidět, že se protein FOXO4-DBD exprimoval v dostatečném množství. V porovnání se vzorky, získanými po niklové chelatační chromatografii FOXO1-DBD a FOXO3-DBD, je zde přítomno podstatně menší množství

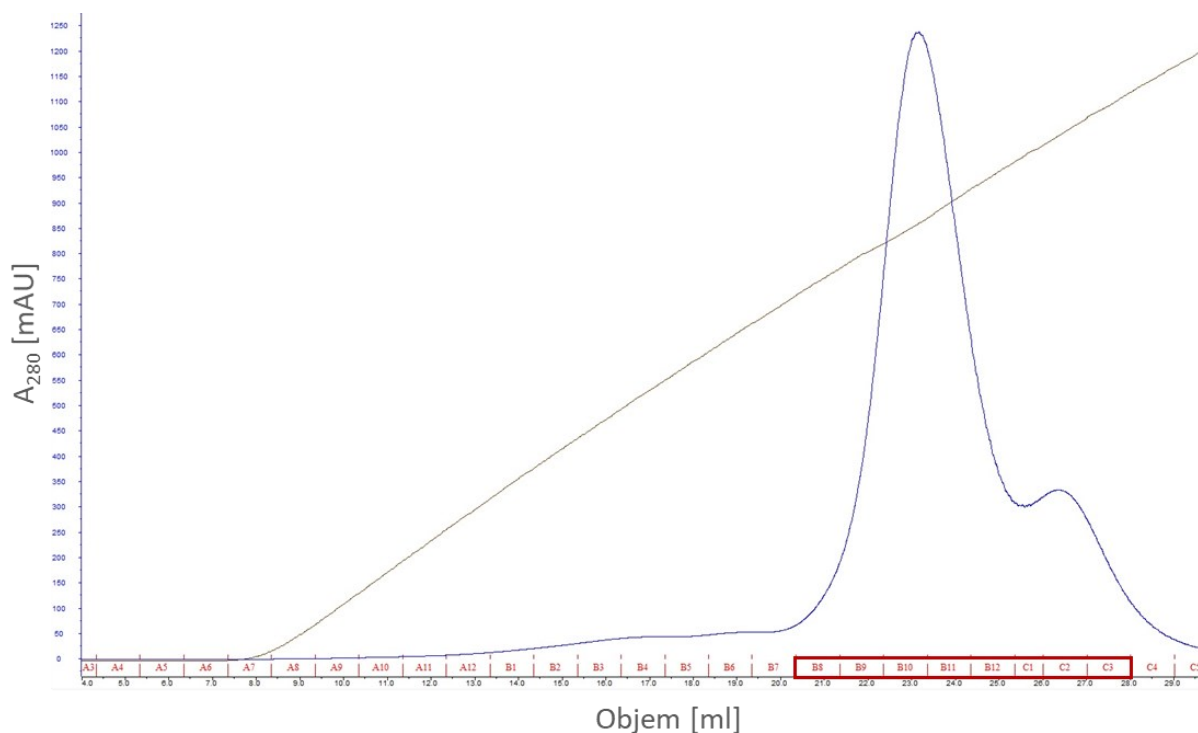
nečistot. Vybrané frakce (1-9) byly sjednoceny a dialyzovány s TEV proteasou pro odštěpení histidinové kotvy.



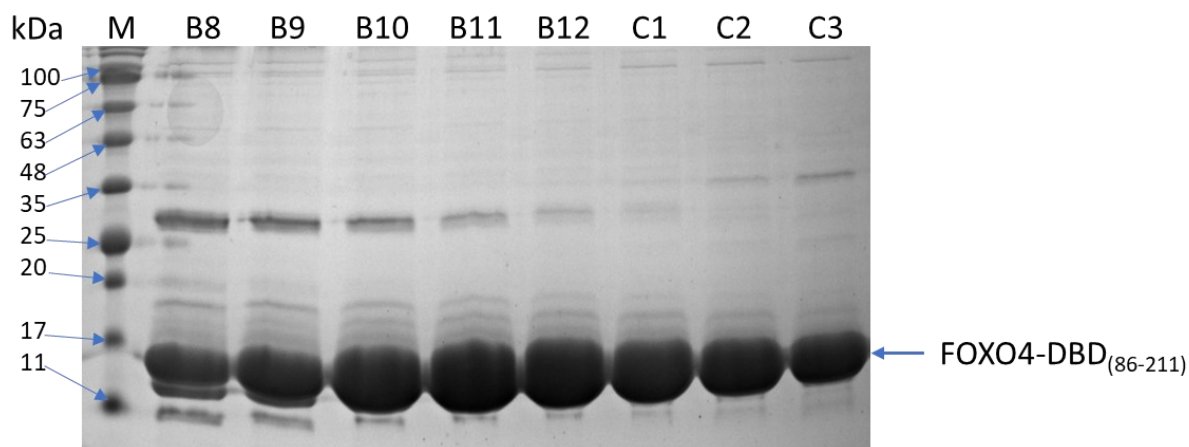
**Obr. 6.11** – Vizualizace 15% (v/v) polyakrylamidového gelu získaného metodou SDS-PAGE po niklové chelatační chromatografii FOXO4-DBD. První jamka obsahovala 3  $\mu$ l standardu molekulových hmotností Black Protein Ladder (Central European Biosystems s.r.o.), který je na obrázku označen jako M. Zbylé jamky obsahovaly roztok proteinu FOXO4-DBD vzniklý smícháním 15  $\mu$ l roztoku dané frakce a 5  $\mu$ l 5 $\times$ SDS-vzorkového pufru. Vybrané frakce byly poté sjednoceny a dialyzovány s TEV proteasou pro odštěpení histidinové kotvy.

### 6.3.2. Heparinová afinitní chromatografie

Dalším purifikačním krokem byla heparinová afinitní chromatografie. K jejímu provedení byla použita kolona HiTrap™ Heparin HP, jež byla připojena k ÄKTAprime pro FPLC. Protein FOXO4-DBD byl eluován gradientem koncentrace chloridu sodného. Objem jímaných frakcí byl 1 ml a mikrozkumavky byly po celou dobu uchovávány na ledu. Průběh chromatografie je zobrazen na Obr. 6.12 na str. 66. Čistota frakcí označených červeným rámečkem byla následně charakterizována pomocí 15% (v/v) polyakrylamidového gelu metodou SDS-PAGE (Obr. 6.13, str. 66). Na obrázku gelu je vidět několik proužků, které odpovídají nečistotám s vyšší i nižší molekulovou hmotností, než má FOXO4-DBD. Tyto nečistoty se pomocí heparinové afinitní chromatografie nepodařilo bohužel oddělit, a proto se přistoupilo k provedení gelové permeační chromatografie.



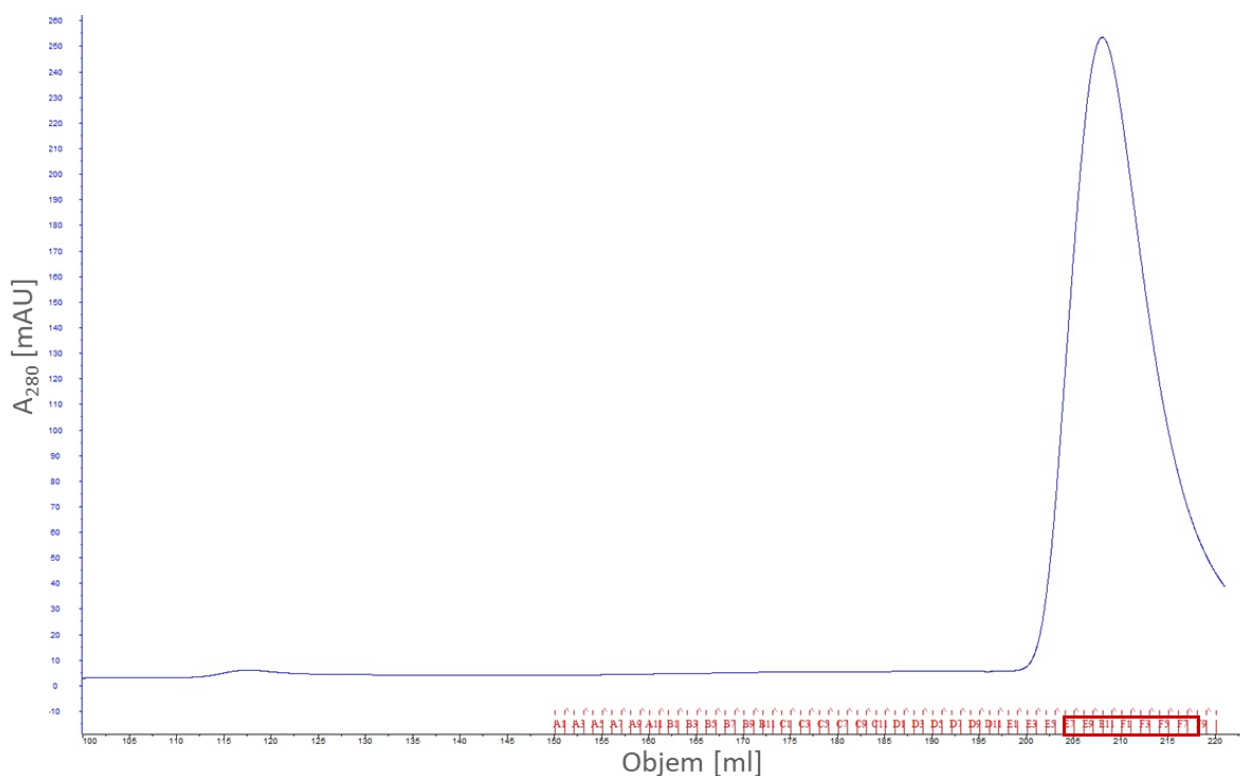
**Obr. 6.12** – Záznam heparinové afinitní chromatografie FOXO4-DBD. Černě je znázorněna křivka závislosti konduktivity na objemu mobilní fáze a modře je závislost absorbance při vlnové délce 280 nm na objemu mobilní fáze. Frakce označené červeným rámečkem byly vybrány pro analýzu metodou SDS-PAGE v 15% (v/v) polyakrylamidovém gelu.



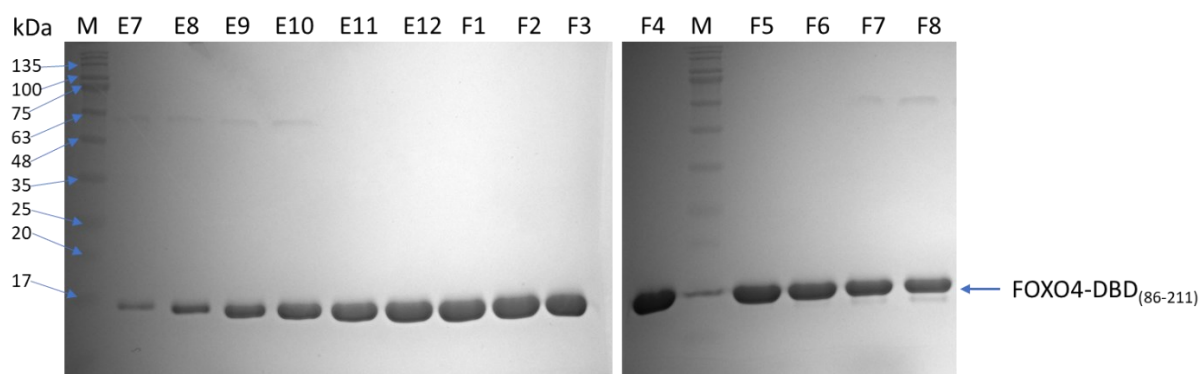
**Obr. 6.13** – Vizualizace 15% (v/v) polyakrylamidového gelu získaného metodou SDS-PAGE po heparinové afinitní chromatografii FOXO4-DBD. První jamka obsahovala 3  $\mu$ l standardu molekulových hmotností Black Protein Ladder (Central European Biosystems s.r.o.), který je na obrázku označen jako M. Zbylé jamky obsahovaly roztok proteinu FOXO4-DBD vzniklý smícháním 15  $\mu$ l roztoku dané frakce a 5  $\mu$ l 5 $\times$ SDS-vzorkového pufru. Vybrané frakce byly následně sjednoceny a zkoncentrovány.

### 6.3.3. Gelová permeační chromatografie

Poslední purifikační krok představovala gelová permeační chromatografie. K separaci byla použita kolona HiLoad Superdex 75 26/600. Vzorky byly před nanesením na kolonu zkoncentrovány ultrafiltrací. Eluát byl uchován v plastových mikrozkuvkách, přičemž objem jednotlivých frakcí činil 1,5 ml. Záznam průběhu chromatografie je zobrazen na Obr. 6.14. Čistota roztoku proteinu byla následně charakterizována metodou SDS-PAGE v 15% (v/v) polyakrylamidovém gelu (Obr. 6.15, str. 68). Z gelu je patrné, že bylo dosaženo dostatečné čistoty. Ve frakcích E7-E10 a F7-F8 je vidět nepatrný proužek odpovídající nečistotě s vyšší molekulovou hmotností. Tyto frakce nebyly pro potřeby dalších experimentů použity. Oproti tomu frakce E11-F6 obsahovaly protein o optimální čistotě i výtěžku, a proto byly spojeny, zmrazeny a skladovány v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro další použití.



**Obr. 6.14** – Záznam gelové permeační chromatografie FOXO4-DBD. Křivka znázorňuje závislost absorbance při vlnové délce 280 nm na objemu mobilní fáze. Červeným rámečkem jsou označeny frakce vybrané pro analýzu metodou SDS-PAGE v 15% (v/v) polyakrylamidovém gelu.



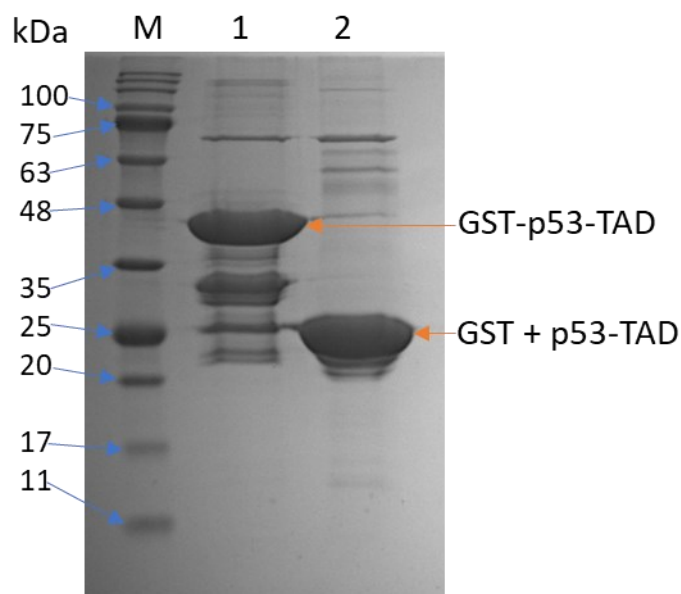
**Obr. 6.15** – Vizualizace 15% (v/v) polyakrylamidového gelu získaného metodou SDS-PAGE po gelové permeační chromatografii. První jamka gelu vlevo a druhá jamka gelu vpravo obsahovaly 3  $\mu$ l standardu molekulových hmotností Black Protein Ladder (Central European Biosystems s.r.o.), který je na obrázku označen jako M. Zbylé jamky obsahovaly roztok proteinu FOXO4-DBD vzniklý smícháním 15  $\mu$ l roztoku dané frakce a 5  $\mu$ l 5 $\times$ SDS-vzorkového pufru. Vybrané frakce (E11-F6) byly následně sjednoceny, zamrazeny a skladovány v  $-80$   $^{\circ}$ C.

## 6.4. Purifikace proteinu p53<sub>(1-93)</sub>

Purifikace transkripční domény transkripčního faktoru p53<sub>(1-93)</sub> zahrnovala následující kroky: GST afinitní chromatografii, aniontově výměnnou chromatografii a gelovou permeační chromatografii. Přítomnost a čistota produktu byla po každém tomto kroku ověřena metodou SDS PAGE (kap. 5.3.5, str. 47). Výtěžek činil celkem 5 mg proteinu z 12 l bakteriální kultury.

### 6.4.1. GST afinitní chromatografie

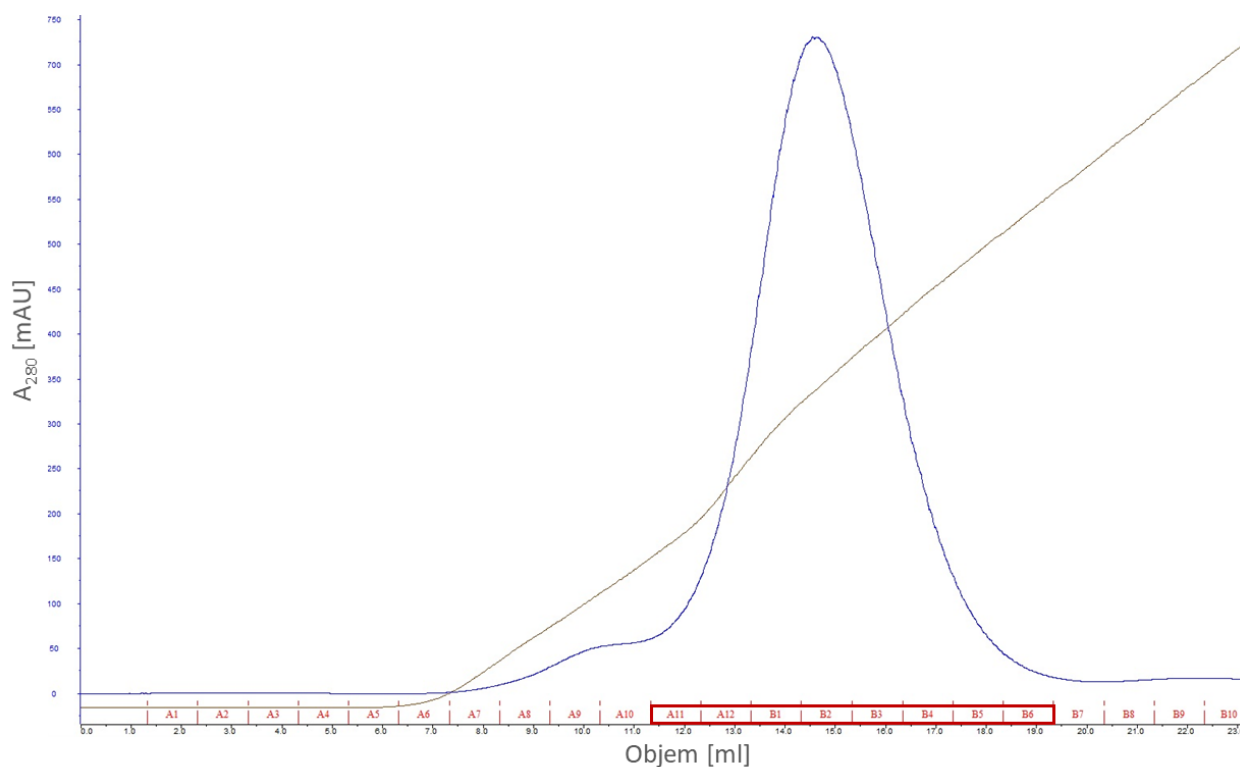
Protein p53-TAD byl exprimován ve fúzi s glutathion-S-transferasou (GST), čehož bylo využito v prvním purifikačním kroku, kterým byla GST afinitní chromatografie. Chromatografie byla provedena na koloně naplněné sepharosou, přičemž se obvykle přistupuje k odštěpení afinitní značky až poté, co je protein z kolony eluován. Odchylkou od běžného postupu bylo štěpení afinitní značky ve chvíli, kdy byl skrz ni protein vázán na matici. Pomocí 15% (v/v) polyakrylamidového gelu byla ověřena úspěšnost odštěpení afinitní značky PreScission proteasou v průběhu GST afinitní chromatografie (Obr. 6.16, str. 69). Jamka č. 1 obsahovala vzorek matrice s navázaným fúzním proteinem GST-p53-TAD. Jamka č. 2 obsahovala vzorek proteinu p53-TAD a odštěpenou GST značku, která byla v tu chvíli stále vázána na matici.



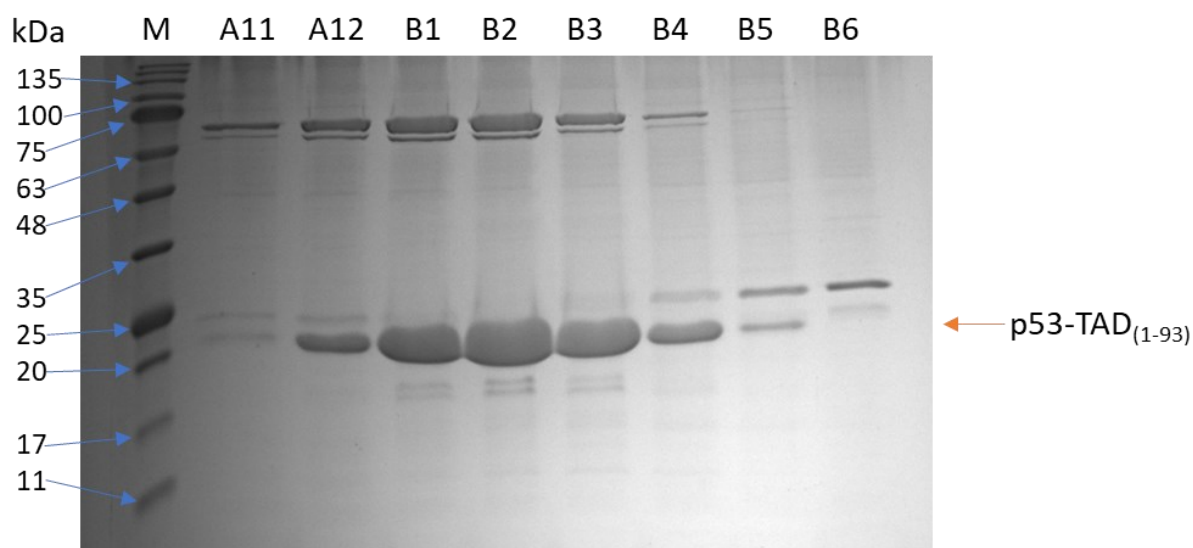
**Obr. 6.16** – Vizualizace 15% (v/v) polyakrylamidového gelu získaného metodou SDS-PAGE po GST afinitní chromatografii. Jamka označená „M“ obsahovala 3  $\mu$ l standardu molekulových hmotností Black Protein Ladder (Central European Biosystems s.r.o.). Jamka č. 1 obsahovala směs 15  $\mu$ l roztoku proteinu GST-p53-TAD vázaného na matici a 5  $\mu$ l 5 $\times$ SDS-vzorkového pufru. Jamka č. 2 obsahovala směs 15  $\mu$ l roztoku proteinu p53-TAD s odštěpenou GST značkou (v tu chvíli stále vázanou na matici) a 5  $\mu$ l 5 $\times$ SDS-vzorkového pufru.

#### 6.4.2. Aniontově výměnná chromatografie

Následujícím purifikačním krokem byla aniontově výměnná chromatografie, která byla provedena na koloně naplněné Mono-Q Sepharosou připojené k ÄKTAprime pro FPLC. Eluce proteinu byl docíleno gradientem iontové síly. Frakce byly jímány po 1 ml do plastových zkumavek umístěných na ledu. Záznam průběhu chromatografie je znázorněn na Obr. 6.17 na str. 70. Čistota frakcí označených červeným rámečkem byla následně analyzována metodou SDS-PAGE v 15% (v/v) polyakrylamidovém gelu (Obr. 6.18, str. 70). Z obrázku je zřejmé, že se podařilo oddělit většinu redundantních proteinů, ale čistota produktu zatím není optimální. Patrné jsou především nečistoty s vyšší molekulovou hmotností odpovídající přibližně 70 kDa. Pro jejich oddělení bylo zapotřebí provést gelovou permeační chromatografií.



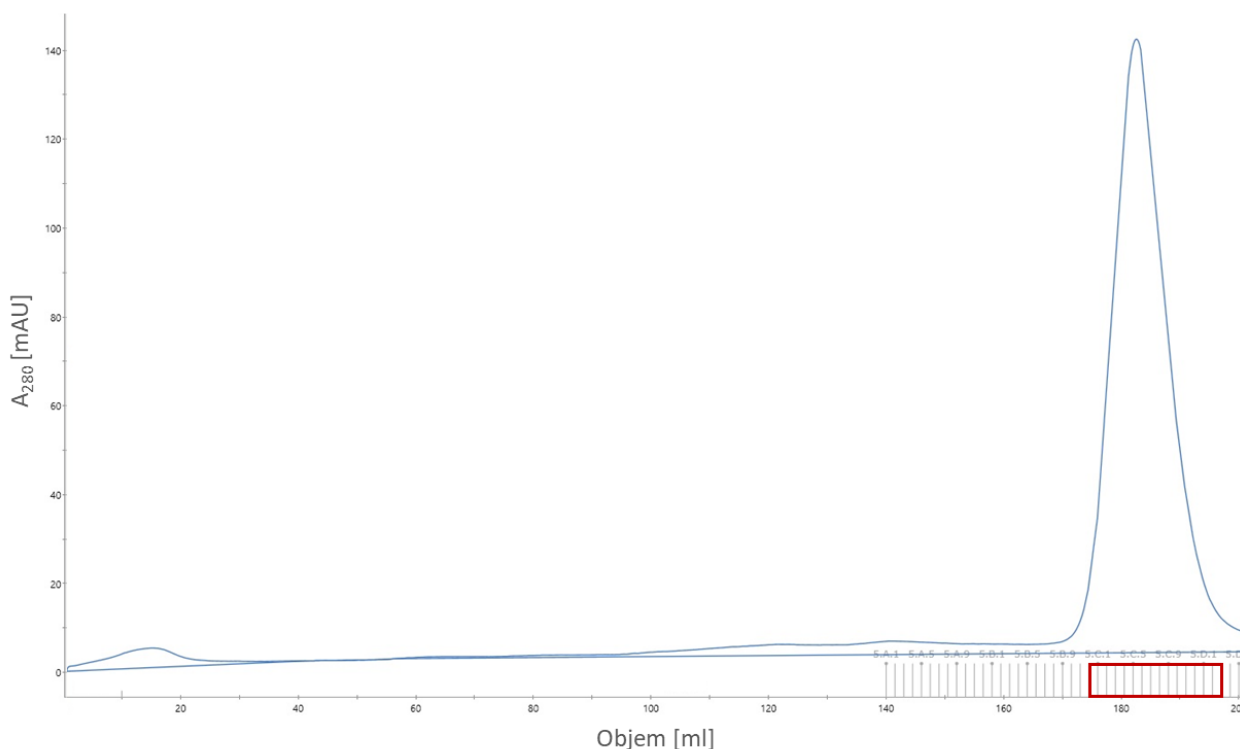
**Obr. 6.17** – Záznam průběhu aniontově výměnné chromatografie proteinu p53-TAD. Černě je znázorněna křivka závislosti konduktivity na objemu mobilní fáze a modře je závislost absorbance při vlnové délce 280 nm na objemu mobilní fáze. Frakce označené červeným rámečkem byly vybrány pro analýzu metodou SDS-PAGE v 15% (v/v) polyakrylamidovém gelu.



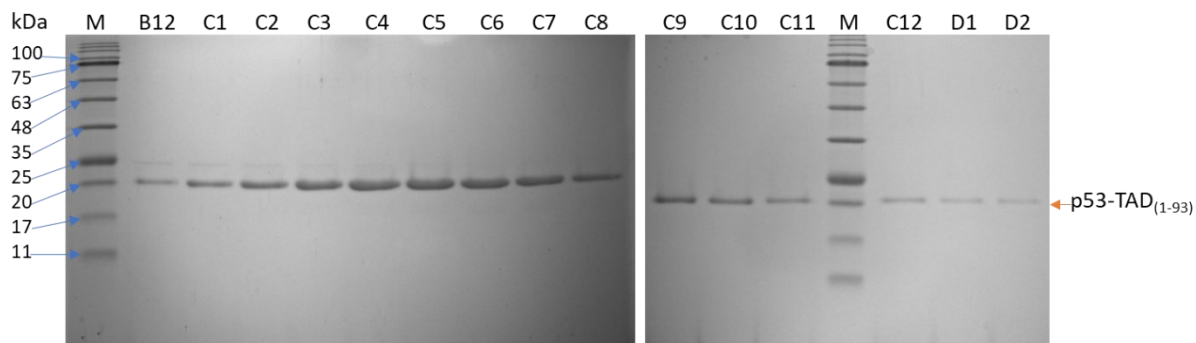
**Obr. 6.18** – Vizualizace 15% (v/v) polyakrylamidového gelu získaného metodou SDS-PAGE po aniontově výměnné chromatografii proteinu p53-TAD. První jamka obsahovala 3  $\mu$ l standardu molekulových hmotností Black Protein Ladder (Central European Biosystems s.r.o.), který je na obrázku označen jako M. Zbylé jamky obsahovaly roztok proteinu p53-TAD vzniklý smícháním 15  $\mu$ l roztoku dané frakce a 5  $\mu$ l 5 $\times$ SDS-vzorkového pufru. Vybrané frakce byly následně sjednoceny a zkoncentrovány.

### 6.4.3. Gelová permeační chromatografie

K oddělení zbylých nečistot byla použita gelová permeační chromatografie. Probíhala na koloně HiLoad Superdex 75 26/600. Vzorky byly před nanesením na kolonu zkoncentrovány ultrafiltrací na objem menší než 2 ml. Eluát byl uchován v plastových mikrozkuvkách o objemu 1,5 ml. Teplotní degradaci proteinu se předešlo umístěním mikrozkuvek na led. Průběh chromatografie je znázorněn na Obr. 6.19. Čistota roztoku proteinu byla následně charakterizována metodou SDS-PAGE v 15% (v/v) polyakrylamidovém gelu (Obr. 6.20, str. 72). Z gelu je patrné, že se téměř všechny nečistoty, včetně těch o molekulové hmotnosti přibližně 70 kDa, podařilo oddělit. Ve frakcích B12-C1 je vidět nepatrný proužek odpovídající nečistotě s vyšší molekulovou hmotností. Tyto frakce nebyly raději pro potřeby dalších experimentů použity. Frakce C2-D2 měly optimální čistotu, a tak byly spojeny, zmrazeny a skladovány v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro další použití.



**Obr. 6.19** – Záznam gelové permeační chromatografie p53-TAD. Křivka znázorňuje závislost absorbance při vlnové délce 280 nm na objemu mobilní fáze. Červeným rámečkem jsou označeny frakce vybrané pro analýzu metodou SDS-PAGE v 15% (v/v) polyakrylamidovém gelu.



**Obr. 6.20** – Vizualizace 15% (v/v) polyakrylamidového gelu získaného metodou SDS-PAGE po gelové permeační chromatografii. První jamka gelu vlevo a čtvrtá jamka gelu vpravo obsahovaly 3  $\mu$ l standardu molekulových hmotností Black Protein Ladder (Central European Biosystems s.r.o.), který je na obrázku označen jako M. Zbylé jamky obsahovaly roztok proteinu p53-TAD vzniklý smícháním 15  $\mu$ l roztoku dané frakce a 5  $\mu$ l 5 $\times$ SDS-vzorkového pufru. Vybrané frakce (C2-D2) byly následně sjednoceny, zamrazeny a skladovány v  $-80$   $^{\circ}$ C.

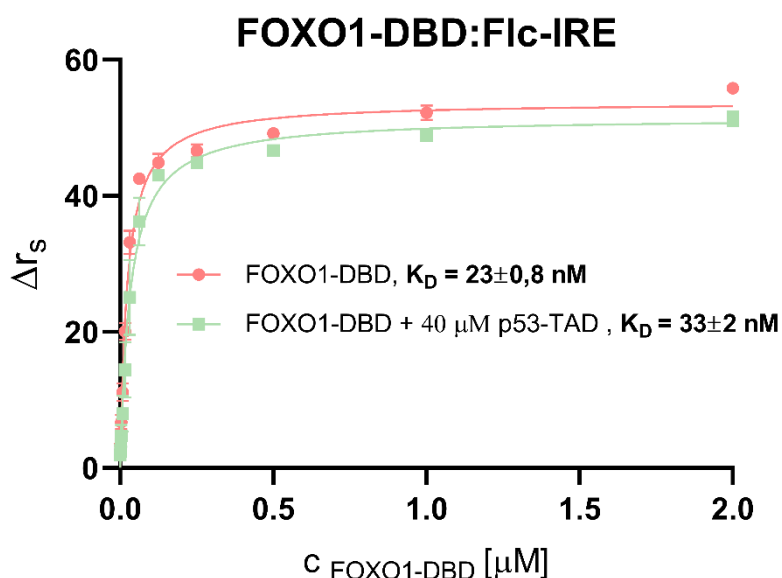
## 6.5. Měření stacionární anisotropie fluorescence

Hlavním cílem této práce bylo ověřit, zda je vzájemná interakce izolovaných domén p53-TAD a FOXO-DBD schopna ovlivnit DNA-vazebné vlastnosti DBD jednotlivých FOXO proteinů. Dalším cílem bylo charakterizovat DNA-vazebné afinity DBD jednotlivých FOXO proteinů a zjistit, zda se nějak liší jejich chování například v důsledku odlišných interakcí s p53-TAD. Za těmito účely bylo provedeno měření stacionární anisotropie fluorescence. Pro měření byly použity dvě konsenzuální sekvence DNA, které jsou rozpoznávány všemi zástupci FOXO proteinů. První sekvence je známá jako vazebný element rodiny DAF-16 (DBE) a druhá je známá jako element reagující na inzulin (IRE). Vazebná afinita FOXO-DBD k oběma zmíněným sekvencím DNA byla stanovena pomocí změn stacionární anisotropie fluorescence fluoresceinu, který byl vždy připojen k 5'-konci jednoho z oligonukleotidů. V průběhu dokončování této diplomové práce byla publikována studie, která ukázala, že interakce transkripční domény p53 a DNA-vazebné domény FOXO4 je zásadní pro stabilitu komplexu p53:FOXO4 a že tvorba tohoto komplexu má vliv na DNA-vazebnou afinitu obou proteinů<sup>78</sup>. Zatím však zůstává otázkou, zda jsou DNA-vazebné vlastnosti FOXO1-DBD a FOXO3-DBD v důsledku interakce s p53-TAD ovlivněny stejnou mírou jako u FOXO4-DBD.

### 6.5.1. Měření DNA-vazebné afinity FOXO-DBD k sekvenci Flc-IRE

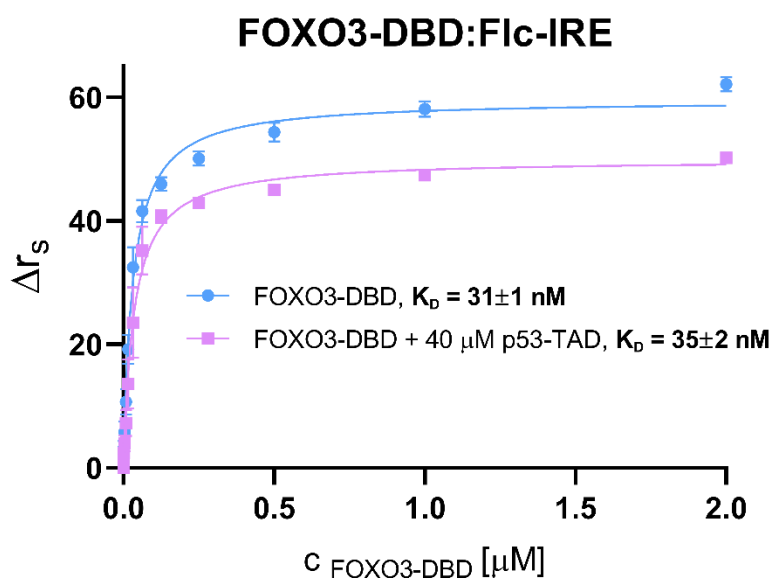
Nejprve byla stanovena afinita všech připravených FOXO-DBD (konkrétně FOXO1<sub>(144-270)</sub>, FOXO3<sub>(142-267)</sub> a FOXO4<sub>(86-211)</sub>) k sekvenci DNA Flc-IRE, a to jak v přítomnosti, tak nepřítomnosti proteinu p53-TAD<sub>(1-93)</sub> o výsledné koncentraci 40  $\mu\text{mol/l}$ . Každé měření bylo provedeno osmkrát (ze dvou nezávislých purifikací, přičemž z každé purifikace bylo měření opakováno čtyřikrát). Hodnoty  $K_D$  byly získány proložení experimentálně získaných bodů rovnicí 5.1 na str. 55.

Pro protein FOXO1-DBD (Obr. 6.21) byla v podmínkách bez přídavku p53 získána hodnota  $K_D = 23 \pm 0,8 \text{ nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . V přítomnosti proteinu p53-TAD byla získána hodnota  $K_D = 33 \pm 2 \text{ nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , což značí mírné snížení DNA-vazebné afinity v porovnání s měřením bez přídavku p53-TAD.



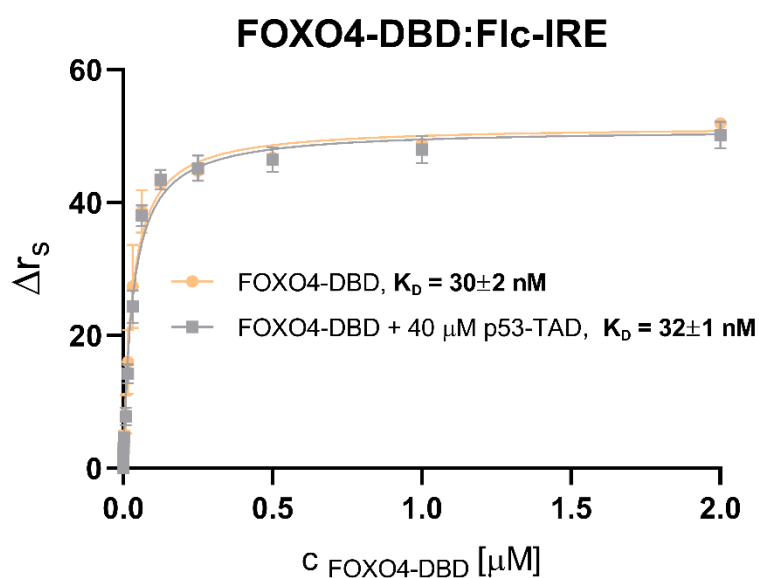
**Obr. 6.21** – Graf závislosti změny stacionární anisotropie fluorescence ( $\Delta r_s$ ) na molární koncentraci FOXO1-DBD. Z obrázku je patrné, že v přítomnosti proteinu p53-TAD dochází k mírnému snížení vazebné afinity k použité sekvenci Flc-IRE v porovnání s měřením bez přídavku p53-TAD. Vynesené hodnoty jsou aritmetickými průměry z osmi měření a uvedené chyby jsou směrodatné odchylky.

Pro protein FOXO3-DBD (Obr. 6.22, str. 74) byla v podmínkách bez přídavku p53-TAD získána hodnota  $K_D = 31 \pm 1 \text{ nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . V přítomnosti proteinu p53-TAD byla získána hodnota  $K_D = 35 \pm 2 \text{ nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , vazebná afinita se tedy téměř nezměnila.



**Obr. 6.22** – Graf závislosti změny stacionární anisotropie fluorescence ( $\Delta r_s$ ) na molární koncentraci FOXO3-DBD. Z obrázku je patrné, že v přítomnosti proteinu p53-TAD nedochází k significantní změně vazebné afinity k použité sekvenci F1c-IRE v porovnání s měřením bez přidavku p53-TAD. Vynesené hodnoty jsou aritmetickými průměry z osmi měření a uvedené chyby jsou směrodatné odchylky.

Pro protein FOXO4-DBD (Obr. 6.23) byla v podmínkách bez přidavku p53-TAD získána hodnota  $K_D = 30 \pm 2$   $\text{nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . V přítomnosti p53-TAD byla získána hodnota  $K_D = 32 \pm 1$   $\text{nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , tedy nebyl pozorován žádný efekt na DNA-vazebnou afinitu.



**Obr. 6.23** – Graf závislosti změny stacionární anisotropie fluorescence ( $\Delta r_s$ ) na molární koncentraci FOXO4-DBD. Z obrázku je patrné, že v přítomnosti proteinu p53-TAD nedochází ke změně vazebné afinity k použité sekvenci F1c-IRE v porovnání s měřením bez přidavku p53-TAD. Vynesené hodnoty jsou aritmetickými průměry z osmi měření a uvedené chyby jsou směrodatné odchylky.

Tabulka 6.1 níže shrnuje všechny výsledky měření DNA-vazebných afinit jednotlivých FOXO-DBD k sekvenci DNA Flc-IRE v přítomnosti a nepřítomnosti p53-TAD. Tyto výsledky ukazují, že přítomnost p53-TAD má negativní vliv na vazebnou afinitu FOXO1-DBD. U FOXO3-DBD a FOXO4-DBD nebyl pozorován výrazný vliv přídavku p53-TAD na DNA-vazebnou afinitu. Z hodnot DNA-vazebných afinit vyplývá, že sekvenci Flc-IRE nejsilněji vázal protein FOXO1-DBD, v porovnání s FOXO3-DBD a FOXO4-DBD, jejichž afinita byla téměř srovnatelná.

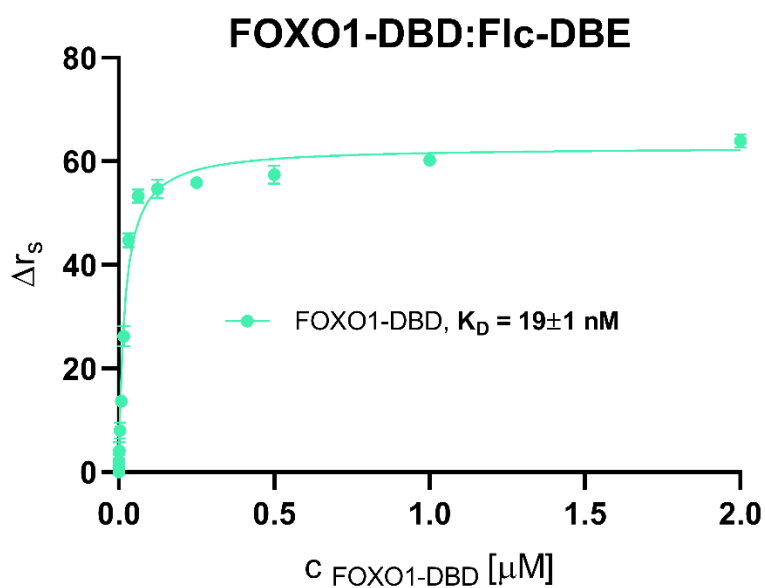
**Tab. 6.1** – Shrnutí výsledků měření DNA-vazebných afinit jednotlivých FOXO-DBD k sekvenci DNA Flc-IRE

	bez přídavku	v přítomnosti 40 $\mu$ M p53-TAD
$K_D$ (FOXO1-DBD) [nmol·dm <sup>-3</sup> ]	23 $\pm$ 0,8	33 $\pm$ 2
$K_D$ (FOXO3-DBD) [nmol·dm <sup>-3</sup> ]	31 $\pm$ 1	35 $\pm$ 2
$K_D$ (FOXO4-DBD) [nmol·dm <sup>-3</sup> ]	30 $\pm$ 2	32 $\pm$ 1

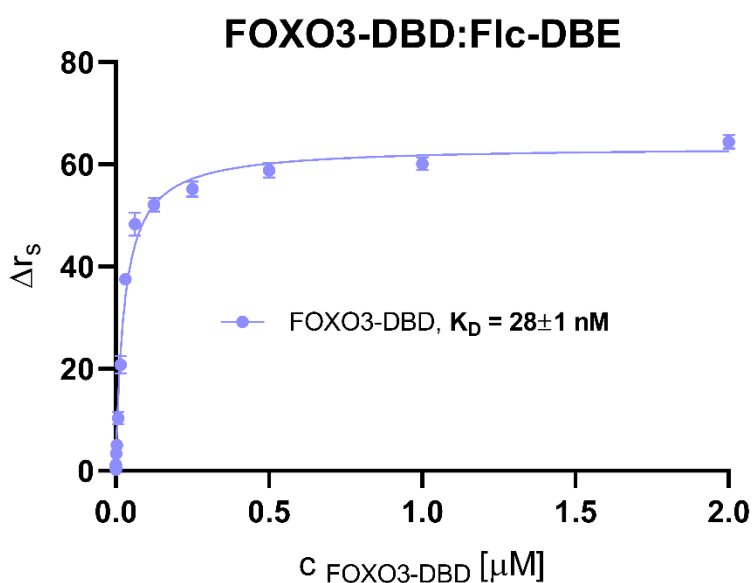
### 6.5.2. Měření DNA-vazebné afinity FOXO-DBD k sekvenci Flc-DBE

Následně byla stejným způsobem stanovena afinita všech připravených FOXO-DBD (konkrétně FOXO1<sub>(144-270)</sub>, FOXO3<sub>(142-267)</sub> a FOXO4<sub>(86-211)</sub>) k sekvenci DNA Flc-DBE. Každé měření bylo provedeno čtyřikrát. Hodnoty  $K_D$  byly získány proložením experimentálně získaných bodů rovnicí 5.1 na str. 55.

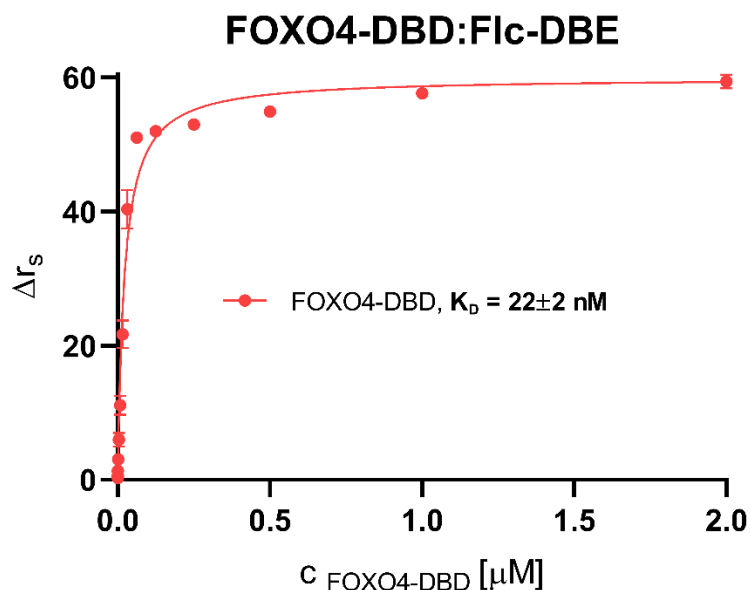
Z Obr. 6.24, Obr. 6.25 a Obr. 6.26 na str. 76-77 je patrné, že k sekvenci Flc-DBE měl nejvyšší afinitu protein FOXO1-DBD s hodnotou  $K_D = 19 \pm 1$  nmol·dm<sup>-3</sup>. Následoval FOXO4-DBD s hodnotou  $K_D = 22 \pm 2$  nmol·dm<sup>-3</sup> a nejmenší afinita byla pozorována u FOXO3-DBD s hodnotou  $K_D = 28 \pm 1$  nmol·dm<sup>-3</sup>.



**Obr. 6.24** – Graf závislosti změny stacionární anisotropie fluorescence ( $\Delta r_s$ ) na molární koncentraci FOXO1-DBD. Ze všech studovaných FOXO-DBD vykazoval FOXO1-DBD nejvyšší afinitu k sekvenci Fic-DBE. Vynesené hodnoty jsou aritmetickými průměry čtyř měření a uvedené chyby jsou směrodatné odchylky.



**Obr. 6.25** – Graf závislosti změny stacionární anisotropie fluorescence ( $\Delta r_s$ ) na molární koncentraci FOXO3-DBD. Protein FOXO3-DBD vykazoval k sekvenci DBE nejnižší afinitu. Vynesené hodnoty jsou aritmetickými průměry čtyř měření a uvedené chyby jsou směrodatné odchylky.



**Obr. 6.26** – Graf závislosti změny stacionární anisotropie fluorescence ( $\Delta r_s$ ) na molární koncentraci FOXO4-DBD. Vynesené hodnoty jsou aritmetickými průměry čtyř měření a uvedené chyby jsou směrodatné odchylky.

Tabulka 6.2 níže shrnuje všechny výsledky měření DNA-vazebných afinit jednotlivých FOXO-DBD k sekvenci DNA F1c-DBE. Z výsledků měření se ukázalo, že všechny FOXO-DBD vážou sekvenci DBE s vyšší afinitou než sekvenci IRE, což je v souladu s literaturou<sup>38</sup>. Ukázalo se, že nejmenší afinitu k této sekvenci vykazoval protein FOXO3-DBD.

**Tab. 6.2** – Shrnutí výsledků měření DNA-vazebných afinit jednotlivých FOXO-DBD k sekvenci DNA F1c-DBE

	$K_D [\text{nmol} \cdot \text{dm}^{-3}]$
<b>FOXO1-DBD</b>	$19 \pm 1$
<b>FOXO3-DBD</b>	$28 \pm 1$
<b>FOXO4-DBD</b>	$22 \pm 2$

## 7. Diskuze

Forkhead box O proteiny jsou podtřídou evolučně konzervovaných transkripčních faktorů, které mají nezastupitelnou roli v regulaci buněčné homeostázy, odpovědi na oxidační stres, senescenci, kontrole buněčného cyklu a v neposlední řadě také v apoptóze. Ačkoliv jsou spojovány s dlouhověkostí, jejich deregulace může vést k onemocněním souvisejícím s věkem jako je například rakovina nebo diabetes mellitus. Navzdory mnoholetému výzkumu zůstává řada otázek, týkajících se biologické role FOXO proteinů, bez odpovědi. Ukázalo se, že všichni členové FOXO podtřídy sdílí vysoký stupeň sekvenční homologie v oblasti DNA-vazebné domény. Není však zcela jasné, zda se drobné strukturní rozdíly patrné z detailního srovnání jejich NMR struktur<sup>22</sup> promítají do jejich schopnosti vázat DNA. Dále není objasněno, jak vazbu jednotlivých FOXO-DBD na DNA ovlivňují protein-proteinové interakce s vazebnými partnery (např. s proteinem p53) a zda se interakce s vazebnými partnery napříč zástupci FOXO nějak liší. Pro zodpovězení těchto otázek byly exprimovány a purifikovány DNA-vazebné domény proteinů FOXO1, FOXO3 a FOXO4 (FOXO1<sub>(144-270)</sub>, FOXO3<sub>(142-267)</sub> a FOXO4<sub>(86-211)</sub>) a transaktivační doména proteinu p53 (p53<sub>(1-93)</sub>). Studované proteiny byly připraveny pomocí série chromatografických metod včetně niklové chelatační chromatografie, heparinové afinitní chromatografie, GST afinitní chromatografie, iontově výměnné chromatografie nebo gelové permeační chromatografie. Jednotlivé konstrukty FOXO-DBD byly pro potřeby srovnání jejich DNA-vazebných afinit cíleně navrženy tak, aby jejich N- a C-koncové segmenty měly stejnou délku. Oba konce se totiž účastní vazby k DNA<sup>22</sup> a případné rozdíly v délce by mohly významně zkreslovat výsledky měření. Zkrácení koncových sekvencí se však negativně promítlo v náročnosti přípravy jednotlivých FOXO-DBD. Vzhledem k veliké sekvenční podobnosti všech tří FOXO-DBD by se dalo očekávat, že jejich příprava bude přibližně stejně náročná. Opak je však pravdou a výtěžky jednotlivých FOXO-DBD se, v porovnání s jinými konstrukty připravovanými v naší laboratoři, poměrně dost lišily. Nejproblematictější byla příprava FOXO3-DBD, kdy výtěžek purifikace činil v přepočtu 0,3 mg proteinu na 1 l bakteriální kultury. Podobně náročná byla příprava FOXO4-DBD, kdy výtěžek odpovídal 0,4 mg proteinu na 1 l bakteriální kultury. Nejvyššího výtěžku bylo dosaženo přípravou FOXO1-DBD, kdy bylo získáno 0,9 mg proteinu na 1 l bakteriální kultury. Výtěžek p53-TAD činil 0,4 mg proteinu na 1 l bakteriální kultury. Navzdory nesnadné přípravě, pandemickým omezením a nutnosti purifikace mnohokrát opakovat, se všechny produkty podařilo připravit v dostatečné čistotě i výtěžku.

Následně byly pomocí měření stacionární anisotropie fluorescence charakterizovány vazebné afinity FOXO1-DBD, FOXO3-DBD a FOXO4-DBD vůči dvěma konsenzuálním sekvencím DNA (Flc-IRE, Flc-DBE). Z výsledků měření se ukázalo, že všechny proteiny FOXO-DBD vázaly sekvenci DBE s vyšší afinitou než sekvenci IRE, což je ve shodě s tím, co pozorovali Brent et al.<sup>38</sup>. Vazebné afinity jednotlivých FOXO-DBD k oběma zmíněným sekvencím se mírně lišily, což může být způsobeno právě drobnými strukturními rozdíly, avšak jejich vliv nebyl nikterak zásadní.

Na základě interakce<sup>79</sup> popsané mezi proteiny FOXO a p53 byly měřeny DNA-vazebné afinity jednotlivých FOXO-DBD k sekvenci IRE v přítomnosti transaktivační domény proteinu p53. V nedávné studii<sup>64</sup> bylo zjištěno, že vzájemná interakce proteinů FOXO4 a p53 může být naprosto klíčová pro regulaci buněčné senescence, neboť vede k zastavení buněčného cyklu a podporuje odolnost buněk vůči apoptóze. Narušení této interakce v senescentních buňkách způsobuje jaderné vyloučení proteinu p53 a následné spuštění apoptózy. Z nedávno publikovaných dat (Mandal et al.<sup>78</sup>) vyplynulo, že tvorba komplexu FOXO4:p53 má zásadní vliv na DNA-vazebnou afinitu p53, přičemž vliv na DNA-vazebnou afinitu FOXO4 je výrazně menší. Dále bylo zjištěno, že hlavním faktorem ovlivňujícím celkovou stabilitu komplexu FOXO4:p53 je právě interakce mezi FOXO4-DBD a TAD doménou na N-konci proteinu p53. Kromě toho celkovou stabilitu komplexu ovlivňuje i nestrukturovaný N-koncový segment FOXO4. Avšak vzhledem k velmi obtížné přípravě proteinů p53 a FOXO plné délky a faktu, že interakce FOXO-DBD s p53-TAD je pro tvorbu komplexů zásadní, se tato práce soustředí právě na interakci těchto dvou izolovaných domén. Tento zjednodušený systém pak může být využitelný např. pro hledání nízkomolekulárních látek schopných inhibovat interakci FOXO-DBD s p53-TAD. Nejdříve je však nutné tuto interakci biofyzikálně charakterizovat a zjistit, zda spolu tyto izolované domény interagují (to bylo předmětem jiné práce v naší laboratoři) a také zda jejich vzájemná interakce ovlivňuje vazbu FOXO-DBD na DNA.

Z měření DNA-vazebných afinit, které byly provedeny v rámci této práce (výsledky uvedeny v Tab. 6.1 na str. 75), bylo zjištěno, že v důsledku protein-proteinové interakce mezi FOXO1-DBD a p53-TAD docházelo k mírnému snížení DNA-vazebné afinity FOXO1-DBD k sekvenci IRE. Tento efekt však nebyl pozorován u FOXO3-DBD ani FOXO4-DBD, což je v rozporu s tím, co pozorovali autoři výše zmíněné studie u FOXO4 plné délky (cit<sup>78</sup>). Pravděpodobným důvodem je nižší stabilita komplexu izolovaných domén v porovnání s proteiny plné délky. Nicméně, mírné snížení vazebné afinity pozorované u FOXO1-DBD

v přítomnosti p53-TAD naznačuje, že FOXO1 by mohlo vázat p53 silněji než FOXO3 a FOXO4. Tedy jinými slovy, že mohou existovat rozdíly v síle interakce jednotlivých FOXO proteinů s p53. Dále výsledky této práce ukázaly, že DNA-vazebné afinity jednotlivých FOXO-DBD vůči konsenzuálním sekvencím jsou téměř stejné. Nicméně je otázkou, zda by tomu bylo tak i v případě použití neoptimálních sekvencí DNA, které by FOXO-DBD vázaly s celkově nižší afinitou. Ale to bude předmětem dalších studií.

## 8. Závěr

- ✓ Byly připraveny DNA-vazebné domény lidských transkripčních faktorů FOXO1, FOXO3 a FOXO4 (FOXO1<sub>(144-270)</sub>, FOXO3<sub>(142-267)</sub> a FOXO4<sub>(86-211)</sub>)
- ✓ Byla připravena transaktivační doména proteinu p53 (p53<sub>(1-93)</sub>).
- ✓ Pomocí měření změn stacionární anisotropie fluorescence byly stanoveny a porovnány DNA-vazebné afinity FOXO1<sub>(144-270)</sub>, FOXO3<sub>(142-267)</sub> a FOXO4<sub>(86-211)</sub> k sekvencím DNA Flc-IRE a Flc-DBE.
- ✓ Pomocí měření změn stacionární anisotropie fluorescence byl posouzen vliv interakce jednotlivých FOXO-DBD s proteinem p53-TAD na DNA-vazebnou afinitu k sekvenci Flc-IRE.

## 9. Literární zdroje

- (1) Jackson, B. C.; Carpenter, C.; Nebert, D. W.; Vasiliou, V. Update of Human and Mouse Forkhead Box (FOX) Gene Families. *Hum. Genomics* **2010**, *4* (5), 345.
- (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* **1989**, *57* (4), 645–658.
- (3) Lai, E.; Prezioso, V. R.; Smith, E.; Litvin, O.; Costa, R. H.; Darnell, J. E. HNF-3A, a Hepatocyte-Enriched Transcription Factor of Novel Structure Is Regulated Transcriptionally. *Genes Dev.* **1990**, *4* (8), 1427–1436.
- (4) Weigel, D.; Jäckle, H. The Fork Head Domain: A Novel DNA Binding Motif of Eukaryotic Transcription Factors? *Cell* **1990**, *63* (3), 455–456.
- (5) Kaestner, K. H.; Knöchel, W.; Martínez, D. E. Unified Nomenclature for the Winged Helix/Forkhead Transcription Factors. *Genes Dev.* **2000**, *14* (2), 142–146.
- (6) Laissue, P. The Forkhead-Box Family of Transcription Factors: Key Molecular Players in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Mol. Cancer* **2019**, *18* (1), 5.
- (7) Nemoto, S.; Fergusson, M. M.; Finkel, T. Nutrient Availability Regulates SIRT1 through a Forkhead-Dependent Pathway. *Science* **2004**, *306* (5704), 2105–2108.
- (8) Boutelle, A. M.; Attardi, L. D. P53 and Tumor Suppression: It Takes a Network. *Trends Cell Biol.* **2021**, *31* (4), 298–310.
- (9) *Transcription: an overview of DNA transcription (article) | Khan Academy.* dostupné na webové stránce: <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/transcription-and-rna-processing/a/overview-of-transcription> (dne 26. 10. 2021).
- (10) Calkhoven, C. F.; Ab, G. Multiple Steps in the Regulation of Transcription-Factor Level and Activity. *Biochem. J.* **1996**, *317* (Pt 2), 329–342.
- (11) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. DNA-Binding Motifs in Gene Regulatory Proteins. *Mol. Biol. Cell 4th Ed.* **2002**.
- (12) Laptenko, O.; Prives, C. Transcriptional Regulation by P53: One Protein, Many Possibilities. *Cell Death Differ.* **2006**, *13* (6), 951–961.
- (13) Smith, N. D.; Rubenstein, J. N.; Eggen, S. E.; Kozlowski, J. M. The P53 Tumor Suppressor Gene and Nuclear Protein: Basic Science Review and Relevance in the Management of Bladder Cancer. *J. Urol.* **2003**, *169* (4), 1219–1228.
- (14) Olivier, M.; Hollstein, M.; Hainaut, P. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2* (1), a001008.
- (15) The Structure of P53 Tumour Suppressor Protein Reveals the Basis for Its Functional Plasticity. *EMBO J.* **2006**, *25* (21), 5191–5200.
- (16) Funk, W. D.; Pak, D. T.; Karas, R. H.; Wright, W. E.; Shay, J. W. A Transcriptionally Active DNA-Binding Site for Human P53 Protein Complexes. *Mol. Cell. Biol.* **1992**, *12* (6), 2866–2871.
- (17) Kim, E.; Deppert, W. The Versatile Interactions of P53 with DNA: When Flexibility Serves Specificity. *Cell Death Differ.* **2006**, *13* (6), 885–889.

- (18) Saha, T.; Kar, R. K.; Sa, G. Structural and Sequential Context of P53: A Review of Experimental and Theoretical Evidence. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2015**, *117* (2), 250–263.
- (19) Vogelstein, B.; Lane, D.; Levine, A. J. Surfing the P53 Network. *Nature* **2000**, *408* (6810), 307–310.
- (20) Lai, E.; Clark, K. L.; Burley, S. K.; Darnell, J. E. Hepatocyte Nuclear Factor 3/Fork Head or “Winged Helix” Proteins: A Family of Transcription Factors of Diverse Biologic Function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90* (22), 10421–10423.
- (21) Hannehalli, S.; Kaestner, K. H. The Evolution of Fox Genes and Their Role in Development and Disease. *Nat. Rev. Genet.* **2009**, *10* (4), 233–240.
- (22) 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* **2019**, *8* (9).
- (23) Weigelt, J.; Climent, I.; Dahlman-Wright, K.; Wikström, M. Solution Structure of the DNA Binding Domain of the Human Forkhead Transcription Factor AFX (FOXO4). *Biochemistry* **2001**, *40* (20), 5861–5869.
- (24) Obsil, T.; Obsilova, V. Structure/Function Relationships Underlying Regulation of FOXO Transcription Factors. *Oncogene* **2008**, *27* (16), 2263–2275.
- (25) Golson, M. L.; Kaestner, K. H. Fox Transcription Factors: From Development to Disease. *Dev. Camb. Engl.* **2016**, *143* (24), 4558–4570.
- (26) Zhu, C.-P.; Wang, J.; Shi, B.; Hu, P.-F.; Ning, B.-F.; Zhang, Q.; Chen, F.; Chen, W.-S.; Zhang, X.; Xie, W.-F. The Transcription Factor FOXA2 Suppresses Gastric Tumorigenesis in Vitro and in Vivo. *Dig. Dis. Sci.* **2015**, *60* (1), 109–117.
- (27) Kittappa, R.; Chang, W. W.; Awatramani, R. B.; McKay, R. D. G. The Foxa2 Gene Controls the Birth and Spontaneous Degeneration of Dopamine Neurons in Old Age. *PLoS Biol.* **2007**, *5* (12), e325.
- (28) Mercer, F.; Unutmaz, D. The Biology of FoxP3: A Key Player in Immune Suppression during Infections, Autoimmune Diseases and Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2009**, *665*, 47–59.
- (29) Tikhanovich, I.; Cox, J.; Weinman, S. A. Forkhead Box Class O Transcription Factors in Liver Function and Disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *28* (S1), 125–131.
- (30) Eijkelenboom, A.; Burgering, B. M. T. FOXOs: Signalling Integrators for Homeostasis Maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2013**, *14* (2), 83–97.
- (31) Lin, K.; Dorman, J. B.; Rodan, A.; Kenyon, C. Daf-16: An HNF-3/Forkhead Family Member That Can Function to Double the Life-Span of *Caenorhabditis Elegans*. *Science* **1997**, *278* (5341), 1319–1322.
- (32) Nemoto, S.; Finkel, T. Redox Regulation of Forkhead Proteins through a P66shc-Dependent Signaling Pathway. *Science* **2002**, *295* (5564), 2450–2452.
- (33) 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* (6436), 412–420.
- (34) Boura, E.; Silhan, J.; Herman, P.; Vecer, J.; Sulc, M.; Teisinger, J.; Obsilova, V.; Obsil, T. Both the N-Terminal Loop and Wing W2 of the Forkhead Domain of Transcription

- Factor Foxo4 Are Important for DNA Binding \*. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282 (11), 8265–8275.
- (35) 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 (Pt 2), 629–634.
- (36) Obsil, T.; Obsilova, V. Structural Basis for DNA Recognition by FOXO Proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2011**, 1813 (11), 1946–1953.
- (37) Guo, S.; Rena, G.; Cichy, S.; He, X.; Cohen, P.; Unterman, T. Phosphorylation of Serine 256 by Protein Kinase B Disrupts Transactivation by FKHR and Mediates Effects of Insulin on Insulin-like Growth Factor-Binding Protein-1 Promoter Activity through a Conserved Insulin Response Sequence \*. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274 (24), 17184–17192.
- (38) Brent, M. M.; Anand, R.; Marmorstein, R. Structural Basis for DNA Recognition by FoxO1 and Its Regulation by Posttranslational Modification. *Structure* **2008**, 16 (9), 1407–1416.
- (39) Galili, N.; Davis, R. J.; Fredericks, W. J.; Mukhopadhyay, S.; Rauscher, F. J.; 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.* **1993**, 5 (3), 230–235.
- (40) Kousteni, S. FoxO1, the Transcriptional Chief of Staff of Energy Metabolism. *Bone* **2012**, 50 (2), 437–443.
- (41) Bastie, C. C.; Nahlé, Z.; McLoughlin, T.; Esser, K.; Zhang, W.; Unterman, T.; Abumrad, N. A. FoxO1 Stimulates Fatty Acid Uptake and Oxidation in Muscle Cells through CD36-Dependent and -Independent Mechanisms \*. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280 (14), 14222–14229.
- (42) Nakae, J.; Biggs, W. H.; Kitamura, T.; Cavenee, W. K.; Wright, C. V. E.; 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 (2), 245–253.
- (43) Kornblau, S. M.; Singh, N.; Qiu, Y.; Chen, W.; Zhang, N.; Coombes, K. R. Highly Phosphorylated FOXO3A Is an Adverse Prognostic Factor in Acute Myeloid Leukemia. *Clin. Cancer Res.* **2010**, 16 (6), 1865–1874.
- (44) Kenyon, C. The Plasticity of Aging: Insights from Long-Lived Mutants. *Cell* **2005**, 120 (4), 449–460.
- (45) White, M. F. Insulin Signaling in Health and Disease. *Science* **2003**, 302 (5651), 1710–1711.
- (46) Kenyon, C. J. The Genetics of Ageing. *Nature* **2010**, 464 (7288), 504–512.
- (47) Liu, Y.; Ao, X.; Ding, W.; Ponnusamy, M.; Wu, W.; Hao, X.; Yu, W.; Wang, Y.; Li, P.; Wang, J. Critical Role of FOXO3a in Carcinogenesis. *Mol. Cancer* **2018**, 17 (1), 104.
- (48) Zou, Y.; Tsai, W.-B.; Cheng, C.-J.; Hsu, C.; Chung, Y. M.; Li, P.-C.; Lin, S.-H.; Hu, M. C. Forkhead Box Transcription Factor FOXO3a Suppresses Estrogen-Dependent Breast Cancer Cell Proliferation and Tumorigenesis. *Breast Cancer Res. BCR* **2008**, 10 (1), R21.
- (49) Willcox, B. J.; Donlon, T. A.; He, Q.; Chen, R.; Grove, J. S.; Yano, K.; Masaki, K. H.; Willcox, D. C.; Rodriguez, B.; Curb, J. D. FOXO3A Genotype Is Strongly Associated with Human Longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105 (37), 13987–13992.

- (50) Schultz, M. B.; Sinclair, D. A. When Stem Cells Grow Old: Phenotypes and Mechanisms of Stem Cell Aging. *Dev. Camb. Engl.* **2016**, *143* (1), 3–14.
- (51) Bosch, T. C. G.; Anton-Erxleben, F.; Hemmrich, G.; Khalturin, K. The Hydra Polyp: Nothing but an Active Stem Cell Community. *Dev. Growth Differ.* **2010**, *52* (1), 15–25.
- (52) Michaelson, D.; Korta, D. Z.; Capua, Y.; Hubbard, E. J. A. Insulin Signaling Promotes Germline Proliferation in *C. Elegans*. *Dev. Camb. Engl.* **2010**, *137* (4), 671–680.
- (53) Yang, S.-A.; Wang, W.-D.; Chen, C.-T.; Tseng, C.-Y.; Chen, Y.-N.; Hsu, H.-J. FOXO/Fringe Is Necessary for Maintenance of the Germline Stem Cell Niche in Response to Insulin Insufficiency. *Dev. Biol.* **2013**, *382* (1), 124–135.
- (54) Liu, W.; Li, Y.; Luo, B. Current Perspective on the Regulation of FOXO4 and Its Role in Disease Progression. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2020**, *77* (4), 651–663.
- (55) Biggs, W. H.; 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 Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* **2001**, *12* (6), 416–425.
- (56) Chen, L.; Tang, Y.; Wang, J.; Yan, Z.; Xu, R. MiR-421 Induces Cell Proliferation and Apoptosis Resistance in Human Nasopharyngeal Carcinoma via Downregulation of FOXO4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *435* (4), 745–750.
- (57) Liu, X.; Zhang, Z.; Sun, L.; Chai, N.; Tang, S.; Jin, J.; Hu, H.; Nie, Y.; Wang, X.; Wu, K.; Jin, H.; Fan, D. MicroRNA-499-5p Promotes Cellular Invasion and Tumor Metastasis in Colorectal Cancer by Targeting FOXO4 and PDCD4. *Carcinogenesis* **2011**, *32* (12), 1798–1805.
- (58) Wang, G.-J.; Liu, G.-H.; Ye, Y.-W.; Fu, Y.; Zhang, X.-F. The Role of MicroRNA-1274a in the Tumorigenesis of Gastric Cancer: Accelerating Cancer Cell Proliferation and Migration via Directly Targeting FOXO4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *459* (4), 629–635.
- (59) Araujo, J.; Breuer, P.; Dieringer, S.; Krauss, S.; Dorn, S.; Zimmermann, K.; Pfeifer, A.; Klockgether, T.; Wuellner, U.; Evert, B. O. FOXO4-Dependent Upregulation of Superoxide Dismutase-2 in Response to Oxidative Stress Is Impaired in Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20* (15), 2928–2941.
- (60) van der Horst, A.; Tertoolen, L. G. J.; de Vries-Smits, L. M. M.; Frye, R. A.; Medema, R. H.; Burgering, B. M. T. FOXO4 Is Acetylated upon Peroxide Stress and Deacetylated by the Longevity Protein HSir2(SIRT1). *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (28), 28873–28879.
- (61) Szypowska, A. A.; de Ruiter, H.; Meijer, L. A. T.; Smits, L. M. M.; Burgering, B. M. T. Oxidative Stress-Dependent Regulation of Forkhead Box O4 Activity by Nemo-like Kinase. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *14* (4), 563–578.
- (62) You, H.; Mak, T. W. Crosstalk between P53 and FOXO Transcription Factors. *Cell Cycle* **2005**, *4* (1), 37–38.
- (63) Seoane, J.; Le, H.-V.; Shen, L.; Anderson, S. A.; Massagué, J. Integration of Smad and Forkhead Pathways in the Control of Neuroepithelial and Glioblastoma Cell Proliferation. *Cell* **2004**, *117* (2), 211–223.
- (64) 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.; Willigenburg, H. van; Feijtel, D. A.; Pluijm, I. van der; Essers, J.; Cappellen, W. A. van; IJcken, W. F. van; Houtsmuller, A. B.; Pothof, J.; Bruin, R. W. F. de; Madl, T.; Hoeijmakers, J. H. J.; Campisi, J.; Keizer, P. L. J. de. Targeted

Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell* **2017**, *169* (1), 132-147.e16.

- (65) Le, H. H.; Cinaroglu, S. S.; Manalo, E. C.; Ors, A.; Gomes, M. M.; Duan Sahbaz, B.; Bonic, K.; Origel Marmolejo, C. A.; Quentel, A.; Plaut, J. S.; Kawashima, T. E.; Ozdemir, E. S.; Malhotra, S. V.; Ahiska, Y.; Sezerman, U.; Bayram Akcapinar, G.; Saldivar, J. C.; Timucin, E.; Fischer, J. M. Molecular Modelling of the FOXO4-TP53 Interaction to Design Senolytic Peptides for the Elimination of Senescent Cancer Cells. *EBioMedicine* **2021**, *73*, 103646.
- (66) Coppé, J.-P.; Desprez, P.-Y.; Krtolica, A.; Campisi, J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu. Rev. Pathol.* **2010**, *5*, 99–118.
- (67) Hoekman, M. F. M.; Jacobs, F. M. J.; Smidt, M. P.; Burbach, J. P. H. Spatial and Temporal Expression of FoxO Transcription Factors in the Developing and Adult Murine Brain. *Gene Expr. Patterns GEP* **2006**, *6* (2), 134–140.
- (68) Kim, D. H.; Perdomo, G.; Zhang, T.; Slusher, S.; Lee, S.; Phillips, B. E.; Fan, Y.; Giannoukakis, N.; Gramignoli, R.; Strom, S.; Ringquist, S.; Dong, H. H. FoxO6 Integrates Insulin Signaling with Gluconeogenesis in the Liver. *Diabetes* **2011**, *60* (11), 2763–2774.
- (69) KIM, D. H.; ZHANG, T.; LEE, S.; DONG, H. H. FoxO6 in Glucose Metabolism. *J. Diabetes* **2013**, *5* (3), 233–240.
- (70) Jacobs, F. M. J.; van der Heide, L. P.; Wijchers, P. J. E. C.; Burbach, J. P. H.; Hoekman, M. F. M.; Smidt, M. P. FoxO6, a Novel Member of the FoxO Class of Transcription Factors with Distinct Shuttling Dynamics. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (38), 35959–35967.
- (71) Brown, A. K.; Webb, A. E. Regulation of FOXO Factors in Mammalian Cells. *Curr. Top. Dev. Biol.* **2018**, *127*, 165–192.
- (72) Schmitt-Ney, M. The FOXO's Advantages of Being a Family: Considerations on Function and Evolution. *Cells* **2020**, *9* (3), E787.
- (73) Motta, M. C.; Divecha, N.; Lemieux, M.; Kamel, C.; Chen, D.; Gu, W.; Bultsma, Y.; McBurney, M.; Guarente, L. Mammalian SIRT1 Represses Forkhead Transcription Factors. *Cell* **2004**, *116* (4), 551–563.
- (74) Daitoku, H.; Hatta, M.; Matsuzaki, H.; Aratani, S.; Ohshima, T.; Miyagishi, M.; Nakajima, T.; Fukamizu, A. Silent Information Regulator 2 Potentiates Foxo1-Mediated Transcription through Its Deacetylase Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101* (27), 10042–10047.
- (75) 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* (20), 6984–6994.
- (76) Huang, H.; Tindall, D. J. Regulation of FOXO Protein Stability via Ubiquitination and Proteasome Degradation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2011**, *1813* (11), 1961–1964.
- (77) 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. Sect. D* **2010**, *66* (12), 1351–1357.

- (78) Mandal, R.; Kohoutova, K.; Petrvalska, O.; Horvath, M.; Srb, P.; Veverka, V.; Obsilova, V.; Obsil, T. FOXO4 Interacts with P53 TAD and CRD and Inhibits Its Binding to DNA. *Protein Sci.* **2022**, *31* (5), e4287.
- (79) Nemoto, S.; Fergusson, M. M.; Finkel, T. Nutrient Availability Regulates SIRT1 through a Forkhead-Dependent Pathway. *Science* **2004**, *306* (5704), 2105–2108.