

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Chemie  
Studijní obor: Medicinální chemie



**Adam Brzezina**

Charakterizace vazebného rozhraní komplexu transkripčních faktorů FOXO4 a p53  
Characterization of the binding interface between transcription factors FOXO4 and p53

Bakalářská práce

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

Praha, 2022

**Prohlášení:**

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

V Praze, 24.08.2022

---

## **Poděkování**

V první řadě děkuji svému školiteli prof. RNDr. Tomáši Obšílovi, Ph.D. za odborné rady a vedení při práci. Dále bych chtěl poděkovat svým kolegům Mgr. Kláře Kohoutové a M.Sc. Raju Mandelovi za jejich velkou ochotu, trpělivost a za předání celé řady rad a zkušeností při práci v laboratoři. Děkuji za osobní přístup své konzultantce RNDr. Veronice Obšílové Ph.D. a celému týmu laboratoře Strukturní biologie signálních proteinů Fyziologického ústavu AV. ČR v. v. i. za vytvoření přátelského pracovního prostředí. V neposlední řadě děkuji své rodině a blízkým, kteří mi prokazují ustavičnou podporu od počátku mého studia.

## Abstrakt

Tato práce se zabývá studiem lidských transkripčních faktorů FOXO4 a p53. FOXO4 je členem podrodiny „O“ FOX transkripčních faktorů. Geny kódující FOXO proteiny jsou evolučně konzervované mezi druhy. FOXO transkripční faktory regulují expresi genů, které se podílí na řízení metabolismu, buněčného cyklu a buněčné proliferace, přežití buněk a odolnosti vůči stresu. Pro svou schopnost zastavit buněčný cyklus a vyvolat apoptózu jsou považovány za tumorové supresory. Jejich funkce v rámci tumorigeneze se však ukazuje být složitější, protože nedávné studie poukazují na horší prognózu vývoje nádorů, u kterých je vyšší hladina exprese FOXO4. Protein p53 je důkladně studovaným přirozeně se vyskytujícím tumorovým supresorem. Buněčná odpověď po jeho aktivaci je do jisté míry podobná jako v případě FOXO4, rovněž umí blokovat progresi buněčného cyklu nebo vyvolat apoptózu v závislosti na buněčném typu a závažnosti typu buněčného stresu. FOXO4 i p53 se ukazují být klíčové molekuly ovlivňující stárnutí. Za stresových podmínek spolu p53 a FOXO4 interagují, a společně tak zvyšují expresi proteinu p21, čímž indukují přechod buněk do senescentního stavu. Akumulace senescentních buněk je považována za jednu z hlavních příčin stárnutí a rozvoje s věkem spojených patologií. Tato bakalářská práce vznikla jako součást většího projektu, který si klade za cíl charakterizovat vazebné rozhraní proteinového komplexu FOXO4 s p53. Za tímto účelem byly exprimovány a purifikovány zkrácené konstrukty lidských transkripčních faktorů FOXO4 a p53 (FOXO4-DBD<sub>(86-211)</sub> a p53-TAD<sub>(1-93)</sub>). Pomocí NMR metody paramagnetického zesílení relaxace (PRE NMR) bylo zjištěno, že C-koncová oblast helixu H2 forkhead domény FOXO4 interaguje především s residui 20–26 a 50–58 N-koncové transaktivační domény p53. Tato práce dále pojednává o současných strategiích používaných k vývoji léčiv – tzv. senolytik, která jsou schopna selektivně zabít senescentní buňky. Z předběžných studií se totiž ukazuje, že redukováním počtu senescentních buněk je tlumen chronický zánět a je zlepšena kondice organismu.

**Klíčová slova:** FOXO, p53, buněčná senescence, protein-protein interakce, senolytika

## Abstract

This work deals with the study of human transcription factors FOXO4 and p53. FOXO4 is a member of the "O" subfamily of FOX transcription factors. Genes encoding FOXO proteins are evolutionarily conserved across species. FOXO transcription factors regulate the expression of genes involved in the control of metabolism, cell cycle and cell proliferation, cell survival and stress resistance. They are considered tumour suppressors because of their ability to arrest the cell cycle and induce apoptosis. However, their function in tumorigenesis appears to be more complicated, as recent studies indicate a poorer prognosis for the development of tumours that express higher levels of FOXO4. The p53 protein is a thoroughly studied naturally occurring tumour suppressor. The cellular response after its activation is somewhat similar to that of FOXO4, it can also block cell cycle progression or induce apoptosis depending on the cell type and severity/type of cellular stress. Both FOXO4 and p53 appear to be key molecules affecting aging. Under stress conditions, p53 and FOXO4 interact with each other and together increase the expression of p21 protein, thereby inducing the transition of cells to a senescent state. The accumulation of senescent cells is recognised as one of the main causes of ageing and the development of age-related diseases. This bachelor thesis is part of a larger project that aims to characterize the binding interface of the protein complex between FOXO4 and p53. For this purpose, truncated constructs of the human transcription factors FOXO4 and p53 (FOXO4-DBD<sub>(86-211)</sub>) and p53-TAD<sub>(1-93)</sub>) were expressed and purified. Using the paramagnetic enhancement relaxation NMR (PRE NMR) method, it was found that the C-terminal region of helix H2 of the FOXO4 forkhead domain interacts primarily with residues 20–26 and 50–58 of the N-terminal transactivation domain of p53. This thesis also discusses the current strategies used to develop drugs, so-called senolytics, that are able to selectively kill senescent cells. The preliminary studies show that reducing the number of senescent cells reduces chronic inflammation and improves the body's fitness.

**Keywords:** FOXO, p53, cellular senescence, senolytics, protein-protein interaction

# Obsah

|  |    |
|--|----|
| Seznam použitých zkratk                                    | 7  |
| 1 Úvod   | 10 |
| 2 Literární přehled  | 11 |
| 2.1 Transkripce  | 11 |
| 2.2 Transkripční faktory                                   | 12 |
| 2.3 FOXO transkripční faktory                              | 12 |
| 2.3.1 Regulace aktivity FOXO proteinů                      | 14 |
| 2.3.1 FOXO4 transkripční faktor                            | 15 |
| 2.4 p53 transkripční faktor                                | 16 |
| 2.4.1 Aktivace a regulace aktivity p53                     | 17 |
| 2.4.2 Struktura p53  | 18 |
| 2.5 FOXO4 a p53 při regulaci senescence                    | 19 |
| 2.6 Vzájemná interakce FOXO a p53                          | 20 |
| 2.6.1 Vazebné rozhraní komplexu FOXO4-p53                  | 20 |
| 2.7 Buněčná senescence a stárnutí                          | 21 |
| 2.8 Senolytika   | 22 |
| 3 Cíle práce   | 27 |
| 4 Materiál   | 28 |
| 4.1 Použité chemikálie                                     | 28 |
| 4.2 Použité přístroje                                      | 29 |
| 4.3 Ostatní pomůcky  | 29 |
| 5 Metody   | 31 |
| 5.1 Expresse DBD mutantního proteinu FOXO4 (T134C)         | 31 |
| 5.2 Lyze buněk   | 33 |
| 5.3 Niklová chelatační chromatografie                      | 33 |
| 5.4 Dialýza a štěpení His-tag                              | 35 |
| 5.5 Kationtově výměnná chromatografie                      | 36 |
| 5.6 Gelová permeační chromatografie                        | 37 |
| 5.7 SDS-PAGE   | 38 |
| 5.9 Značení FOXO4-DBD pro PRE NMR experiment               | 40 |
| 5.10 Nukleární magnetická rezonance                        | 42 |
| 5.10.1 Příprava vzorků                                     | 45 |
| 6 Výsledky   | 47 |
| 6.1 Expresse FOXO4-DBD                                     | 47 |
| 6.2 Purifikace FOXO4-DBD                                   | 47 |
| 6.2.1 Niklová chelatační chromatografie                    | 47 |
| 6.2.2 Dialýza a štěpení trombinem                          | 48 |
| 6.2.3 Kationtově výměnná chromatografie                    | 49 |
| 6.2.4 Gelová permeační chromatografie                      | 50 |
| 6.3 Značení FOXO4-DBD radikálem 3-(2-Iodoacetamido)-PROXYL | 51 |
| 6.4 Studium interakce p53-TAD a FOXO4-DBD pomocí NMR       | 53 |
| 7 Diskuze  | 55 |
| 8 Závěr  | 57 |
| 9 Seznam citované literatury                               | 58 |

## Seznam použitých zkratek

|                      |  |
|----------------------|--|
| Akt/PKB .....        | protein kinasa B   |
| ATP .....            | adenosintrifosfát  |
| Å .....              | Ångstrom – jednotka délky; 1 Å = 10 <sup>-10</sup> m                                     |
| BI21(DE3) .....      | kmen bakterií <i>E. coli</i> vhodný pro expresi proteinů                                 |
| bp .....             | základní jednotka dvouřetězcových nukleových kyselin (z angl. <u>b</u> ase <u>p</u> air) |
| C .....              | cystein  |
| CDK .....            | cyklin dependentní kinasa  |
| CDKI .....           | inhibitor cyklin dependentních kinas   |
| cDNA .....           | komplementární DNA (z angl. <u>c</u> omplementary DNA)                                   |
| CG .....             | srdeční glykosidy (z angl. <u>c</u> ardiac <u>g</u> lykosides)                           |
| CR .....             | konzervovaný region (z ang. <u>c</u> onserved <u>r</u> egion)                            |
| CTP .....            | cytidintrifosfát   |
| CV .....             | objem kolony (z angl. <u>c</u> olumn <u>v</u> olume)                                     |
| Daf-16 .....         | ortholog FOXO proteinů u <i>Caenorhabditis elegans</i>                                   |
| DBD .....            | DNA-vazebná doména (z ang. <u>D</u> NA <u>b</u> inding <u>d</u> omain)                   |
| DBE .....            | Daf-16 vazebný element (z angl. <u>d</u> af-16 family <u>b</u> inding <u>e</u> lement)   |
| DNA .....            | deoxyribonukleová kyselina   |
| DRI .....            | D-retro-inverso peptid   |
| 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                                       |
| GTP .....            | guanosintrifosfát  |
| His .....            | histidin   |
| His-tag .....        | histidinová kotva  |
| IPSL .....           | rádikal 3-(2-iodoacetamido)-PROXYL   |
| IPTG .....           | isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid   |

|                 |  |
|-----------------|--|
| IRE .....       | insulin responsivní element  |
| LB médium ..... | médium pro bakterie dle Luria-Bertani (z angl. <u>lysogeny broth</u> )                                 |
| Mb .....        | násobná jednotka dvouřetězcových nukleových kyselin (z angl. <u>mega base</u> ); 1 Mb = 1 000 000 bp   |
| MDM2 .....      | ubikvitin ligasa (z angl. <u>murine double minute 2</u> )  |
| mRNA .....      | mediátorová RNA (z angl. messenger RNA)  |
| N .....         | asparagin  |
| NES .....       | nukleární exportní sekvence  |
| NLS .....       | nukleární lokalizační sekvence   |
| NMR .....       | nukleární magnetická rezonance   |
| OD .....        | optická hustota (z angl. <u>optical density</u> )  |
| PBS .....       | fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)   |
| PCC1 .....      | procyanidin C1   |
| PI3K .....      | fosfatidylinositol-3-kinasa  |
| PRD .....       | doména bohatá na prolin (z ang. <u>prolin rich domain</u> )  |
| PRE .....       | paramagnetické zesílení relaxace (z angl. paramagnetic relaxation enhancement)                         |
| Q .....         | glutamin   |
| RNA .....       | ribonukleová kyselina  |
| ROS .....       | reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)  |
| S .....         | serin  |
| SASP.....       | fenotyp související se senescentními buňky (z angl. <u>senescence-associated secretory phenotype</u> ) |
| SA-β-gal .....  | SA-β-galaktosidasa (z angl. <u>senescence associated β-galactosidase</u> )                             |
| SC.....         | senescentní buňky (z angl. <u>senescent cells</u> )  |
| SCAP .....      | anti-apoptické dráhy senescentních buněk (z angl. <u>senescent cells anti-apoptic pathways</u> )       |
| SDS .....       | dodecylsírán sodný (z angl. sodium dodecyl sulfate)  |
| SDS-PAGE .....  | elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS   |
| SGK .....       | sérum a glukokortikoid-regulovaná kinasa   |
| SIRT1 .....     | deacetylasa ze skupiny sirtuin proteinů  |
| SOD2 .....      | superoxid dismutasa 2  |
| T .....         | threonin   |

|             |   |
|-------------|---|
| TAD .....   | transaktivační doména                         |
| TEMED ..... | N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin           |
| Tris .....  | tris(hydroxymethyl)aminomethan                |
| U .....     | jednotka (z angl. units)                      |
| USP7 .....  | ubikvitin-specifická peptidasa                |
| UTP .....   | uridintrifosfát                               |
| v/v .....   | objem/objem (z angl. volume/volume)           |
| W .....     | tryptofan                                     |
| wt .....    | divoký typ (z ang. <u>w</u> ild <u>t</u> ype) |
| w/v .....   | hmotnost/objem (z angl. weight/volume)        |

# 1 Úvod

Transkripční faktory jsou proteiny, které regulují genovou expresi na úrovni transkripce. Váží se na specifické sekvence DNA v regulačních místech genů, a tím podporují nebo inhibují zahájení transkripce. Tato práce se zabývá dvěma transkripčními faktory: FOXO4 a p53, u kterých lze najít řadu propojení v rámci jejich funkce, regulace a v rámci signalizačních drah, v nichž vystupují.

FOXO4 je členem podrodiny „O“ FOX (Forkhead box) transkripčních faktorů. FOX transkripční faktory jsou evolučně velmi staré. První forkhead protein byl objeven u octomilky obecné (*D. melanogaster*), u níž byla také objevena mutace v genu kódující forkhead protein, která vedla k defektům při tvarování hlavy octomilky během embryogeneze. Embrya octomilky nesoucí tuto mutaci měly charakteristický tvar hlavy připomínající vidličku (angl. fork), odtud pochází pojmenování forkhead<sup>1</sup>. FOX proteiny jsou hojně rozšířeny mezi druhy, najdeme je zejména u obratlovců, včetně člověka. Dosud bylo identifikováno přes 100 zástupců FOX proteinů a všechny je spojuje evolučně vysoce konzervovaná forkhead doména, která specificky váže DNA. FOXO4 je celotělově exprimovaný transkripční faktor a reguluje celou řadu genů podílejících se zejména na buněčné homeostáze, metabolismu, ochraně před oxidačním stresem a na indukci apoptózy nebo senescence.

p53 je rovněž celotělově exprimovaný, jedná se o nejznámější tumorový supresor a přezdívá se mu „strážce genomu“. Tuto přezdívku dostal, protože jeho primární rolí je ochrana před genotoxickým stresem. p53 je aktivován zejména v návaznosti na poškození DNA, ale také při intenzivní onkogenní signalizaci nebo oxidačním stresem. Buněčná odpověď jeho aktivace je podobná jako u FOXO4, podle závažnosti/typu poškození může vyvolat apoptózu nebo senescenci.

Oba transkripční faktory jsou v poslední době často skloňovány se stárnutím, kde pravděpodobně sehrávají klíčovou roli. Jejich dysregulace je spojena s celou řadou nemocí včetně nádorů. Molekulární mechanismy, kterými FOXO4 a p53 regulují stárnutí však zůstávají převážně záhadou. Jejich centrální roli v regulaci buněčné senescence podporuje řada důkazů. Vzhledem k tomu, že p53 i FOXO4 jsou považovány za potenciální cíle léčby rakoviny, ale i dalších nemocí, jejichž hlavním rizikovým faktorem je chronologické stárnutí, tak porozumění jejich funkčního propojení, a porozumění detailům regulace jejich aktivity, může pomoci řídit výzkum jejich klinického využití tím správným směrem.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Transkripce

Transkripce je proces, při kterém je informace v genu, uložená v sekvenci deoxyribonukleotidů tvořících DNA, přepsána do sekvence RNA. Vzniklá RNA se nazývá primární transkript a je syntetizována na základě komplementarity dusíkatých bází podle vzoru nekódujícího vlákna DNA za pomoci enzymu DNA-dependentní RNA polymerasy. Primární transkript u eukaryot podléhá post-transkripčním úpravám, jejichž výsledkem může být buď mRNA (v případě, že původní gen kóduje protein) nebo funkční nekódující RNA. Na rozdíl od prokaryot, které mají pouze jednu RNA polymerasu, mají všechny eukaryoty alespoň tři typy RNA polymeras, přičemž jednotlivé typy se liší tím, že jsou zodpovědné za syntézu odlišných podtypů RNA. Všechny protein-kódující geny jsou přepisovány do mRNA prekurzorů RNA polymerasou II, kdežto RNA polymerasy I a III přepisují funkční nekódující RNA<sup>2</sup>.

Proces transkripce má tři fáze: iniciaci, elongaci a terminaci. V iniciační fázi dochází k navázání transkripčních faktorů a RNA polymerasy na promotor. Promotor je úsek DNA sekvence daného genu, kde je zahájena transkripce. RNA polymerasa rozvíjí dvojité helix DNA a přesouvá se k místu startu transkripce. V elongační fázi RNA polymerasa čte templátové (nekódující) vlákno DNA ve směru od 3' do 5' konce a katalyzuje postupné připojování ribonukleosidtrifosfátů (ATP, UTP, GTP, CTP) za vzniku fosfodiesterových vazeb. Vlákno RNA je tudíž syntetizováno v opačném směru (5'→3'). Transkripce je ukončena v momentě, kdy dojde k přepisu tzv. terminační sekvence, u protein kódujících genů se jedná o sekvenci AAUAAA (tzv. polyadenylační signál)<sup>3</sup>, kde A = adenin a U = uracil. Nově vytvořené RNA vlákno je uvolněno a u eukaryot dále podléhá post-transkripčním úpravám. Na 5' konci pre-mRNA je přes trifosfátový můstek připojena 7-methylguanositová hlavička, zatímco na 3' konci je připojen tzv. polyadenylátový ocas, sestávající z několika desítek adenylátových zbytků. Tyto modifikace slouží k lokalizaci mRNA do cytosolu a chrání konce řetězce před exonukleasami. Další post-transkripční modifikací je sestřih (z angl. splicing), sloužící k specifickému vyštěpení nekódujících sekvencí primárního transkriptu (tzv. intronů)<sup>4</sup>. Transkripce, jakožto první ze sledu kroků genové exprese, pro buňku zcela zásadního procesu, je přísně regulována pomocí tzv. transkripčních faktorů.

## 2.2 Transkripční faktory

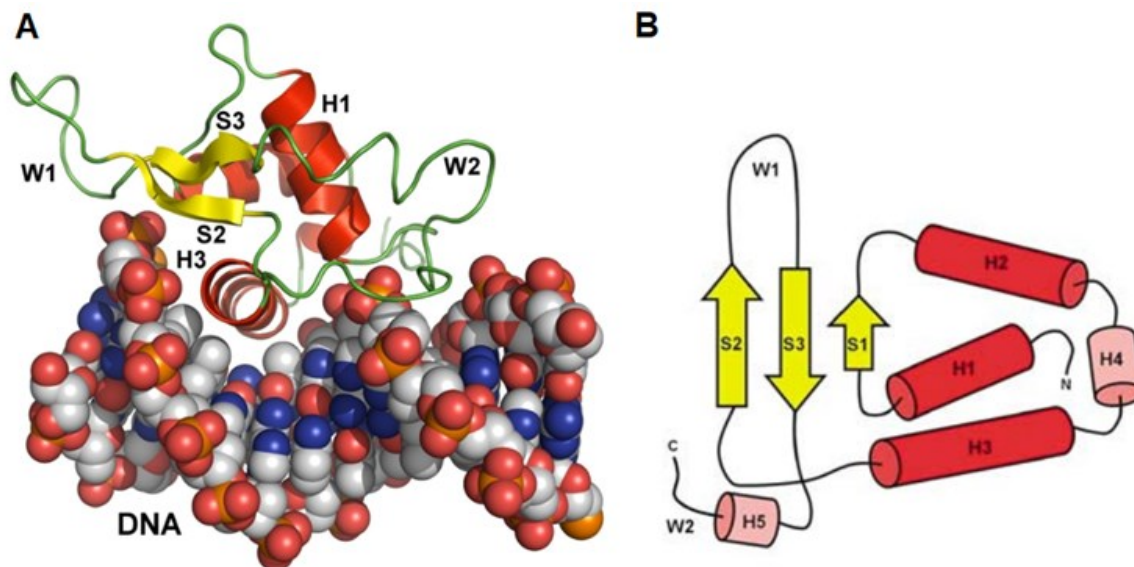
Transkripční faktory jsou proteiny, které regulují transkripci v její iniciační fázi tak, že se naváží na specifická místa v regulačních oblastech DNA – tzv. elementech promotoru. Transkripční faktory mohou usnadňovat nebo znemožnit vazbu RNA polymerasy na promotor, a tak rozhodnout o tom, zda transkripce bude iniciována nebo nikoliv. Takové transkripční faktory označujeme jako induktory/represory (souhrnně specifické transkripční faktory). Kromě specifických transkripčních faktorů rozlišujeme také obecné (bazální) transkripční faktory – které jsou potřebné k vytvoření tzv. iniciačního komplexu. Bez obecných transkripčních faktorů by nebylo možné docílit stabilní interakce RNA polymerasy s promotorem, potřebné k zahájení transkripce.

Vazebná místa pro induktory a represory přitom nejsou v bezprostředním kontaktu promotoru, ale jsou často velmi vzdáleny (100 bp až 1 Mb v obou směrech od regulovaného genu – anglicky „upstream“ nebo „downstream“). Bylo popsáno více modelů, které vysvětlují aktivaci cíleného genu vzdálenými induktory. Jednotlivé modely se přitom navzájem nevylučují, ale doplňují. Jedna z možností aktivace je interakce mezi vzdálenými transkripčními faktory a bazálními transkripčními faktory vázanými na promotoru díky tvorbě smyček ve struktuře DNA. Interakce může být přímá a nebo skrze mediátorové proteiny iniciačního komplexu<sup>5</sup>.

## 2.3 FOXO transkripční faktory

FOXO transkripční faktory tvoří podskupinu „O“ rodiny Forkhead box (zkráceně FOX) transkripčních faktorů, která je charakteristická evolučně vysoce konzervovanou DNA vazebnou doménou<sup>6</sup> (zkráceně DBD, z angl. DNA binding domain). DBD FOX transkripčních faktorů sestává přibližně ze ~100 aminokyselin<sup>7</sup> a její struktura byla poprvé charakterizována u FoxA3/HNF-3 $\gamma$  v komplexu s DNA metodou rentgenové krystalografie<sup>8</sup>. Jedná se o kompaktní  $\alpha/\beta$  protein tvořený třemi  $\alpha$  helixy (H1-H3), třemi  $\beta$  řetězci (S1-S3) a dvěma smyčkami (W1-W2), viz *Obrázek 2.1* na str. 13. Ze zjištěné struktury FoxA3/HNF-3 $\gamma$  byla DBD na základě podobnosti s tělem motýla nazvána „okřídlená šroubovice“ (z angl. winged helix), neboť hlavní kontakt s DNA je zajištěn  $\alpha$ -helixem H3 („hrudník“), který leží uvnitř velkého žlábků DNA přibližně kolmo na osu šroubovice, je lemován dvěma dlouhými smyčkami („křídly“ W1 a W2), které se jsou v blízkém kontaktu

pentosa-fosfátové páteře DNA a atomů dusíkatých bází<sup>8</sup>. Interakce mezi  $\alpha$ -helixem H3 a DNA je bázově specifická, aminokyselinové zbytky účastnící se této interakce jsou zachovány u všech FOX proteinů a rozpoznávají sekvenci 5'-(A/C)AA(C/T)A-3'<sup>9</sup>, kde A = adenin, C = cytosin, T = thymin, G = guanin.

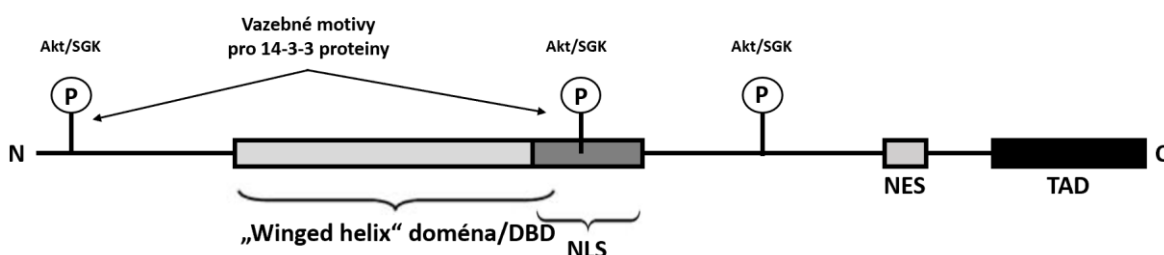


**Obrázek 2.1** – A Struktura FoxA3-DBD v komplexu s DNA – FoxA3 je ve stuhovém zobrazení a DNA jako sférický model. Převzato<sup>10</sup>. B Topologický přehled motivů sekundární struktury DBD FOX proteinů.  $\alpha$ -helixy H4 a H5 jsou přítomny pouze u některých FOX proteinů. Řetězec S1, vložený mezi  $\alpha$ -helixy H1 a H2 tvoří s  $\beta$ -řetězci S2 a S3 antiparalelní tří řetězcový  $\beta$ -skládaný list. Převzato<sup>11</sup>.

FOX proteiny se vyskytují u celé řady organismů, zejména u obratlovců v živočišné říši, ale také u jednobuněčných kvasinek<sup>6,12</sup>, zatímco u rostlin geny pro FOX proteiny chybí<sup>13</sup>. U člověka bylo identifikováno 50 proteinů s charakteristickou winged helix doménou<sup>14</sup>, které jsou kategorizovány do 19 podrodin (FOXA až FOXS) na základě podobnosti v sekvenci aminokyselin uvnitř a mimo DBD<sup>15</sup>.

Do FOXO podrodiny jsou řazeny 4 proteiny: FOXO1, FOXO3, FOXO4 a FOXO6<sup>16</sup>. Pro molekuly FOXO proteinů jsou společné kromě vysoce konzervované winged helix domény další 3 domény: nukleární lokalizační sekvence (NLS), nukleární exportní sekvence (NES) a transkripční doména na C-konci (TAD), viz *Obr. 2.2* na str. 14. V některé literatuře se uvádí jako další doména konzervovaný region 1 na N-konci (CR1, z angl. conserved region 1)<sup>17,18</sup>. S výjimkou NES jsou zejména právě v těchto doménách u FOXO proteinů evolučně konzervovány aminokyselinové residua<sup>11</sup>. Motivy sekundární struktury v molekulách FOXO proteinů však nalezneme pouze v rámci DBD (v případě FOXO4 residua 86-211), zbylá část molekuly je tvořena nestrukturovanými oblastmi<sup>17</sup>, které jsou nezbytné pro regulaci jejich funkce. Délka lidského FOXO4 proteinu činí přibližně 500

aminokyselin, čímž se odlišuje od ostatních FOXO proteinů, které jsou delší a všechny mají podobnou délku přibližně 650 aminokyselin<sup>11</sup>.



**Obrázek 2.2 – Schématické znázornění doménové organizace FOXO proteinů.** Na obrázku jsou vyznačeny 4 domény společné pro FOXO proteiny: „winged helix“ doména (DBD), nukleární lokalizační sekvence (NLS), nukleární exportní sekvence (NES) a transaktivační doména (TAD). Fosforylační místa pro Akt/SGK zprostředkovanou fosforylací jsou znázorněny symbolem P.

Role FOXO proteinů spočívá v regulaci osudu buňky. FOXO proteiny jsou klíčovými hráči buněčné smrti, proliferace, progresu buněčného cyklu, metabolismu a stresové odpovědi, čímž ovlivňují buněčnou homeostázu, buněčné stárnutí a tumorigenezi. FOXO1, 3 a 4 jsou exprimovány ve všech tkáních, zatímco exprese FOXO6 je omezená na tkáň centrálního nervového systému. Předpokládá se, že exprese FOXO regulovaných genů může být řízena kterýmkoli členem FOXO podrodiny, a že specifita jednotlivých FOXO proteinů je částečně určena rozdíly v jejich expresních obrazcích<sup>17,19</sup>. Všechny FOXO transkripční faktory specificky rozpoznávají sekvenci 5'-GTAAA(C/T)AA-3'. Tato sekvence je známá pod názvem DBE (z angl. *daf-16* family *b*inding *e*lement). S nižší afinitou FOXO rozpoznávají sekvenci 5'-(A/C)(A/C)AAA(C/T)AA-3', známou jako IRE (z angl. *i*nsuline-*r*esponsive *e*lement)<sup>20</sup>.

### 2.3.1 Regulace aktivity FOXO proteinů

Transkripční aktivita FOXO proteinů je negativně regulována prostřednictvím insulin/PI3K/Akt signalizační dráhy. Signalizace v rámci této dráhy je zahájena vazbou inzulinu nebo růstových faktorů na tyrosin kinasové receptory. Tato vazba aktivuje fosfatidylinositol-3-kinasu, PI3K, která následně aktivuje protein kinasu B (zkráceně PKB nebo Akt) a sérum/glukokortikoid-regulovanou proteinkinasu (zkráceně SGK). Obě tyto protein kinasy patří mezi serin/threoninové kinasy, které fosforylují FOXO proteiny na residuích T32, S253 a S315 v sekvenci FOXO3<sup>21</sup>. Fosforylační místa pro Akt/SGK zprostředkovanou fosforylací jsou v rámci doménové struktury FOXO proteinů znázorněny na *Obr. 2.2*. Fosforylací FOXO3 na T32 a S253 vzniká vazebné místo pro 14-3-3 protein,

který se váže jako dimer a zapříčiní export FOXO proteinů z jádra do cytoplasmy<sup>22</sup>. V cytoplasmě FOXO proteiny nemohou vykonávat funkci induktorů svých cílových genů<sup>23</sup> a jsou zde degradovány<sup>24</sup>.

FOXO proteiny jsou dále regulovány řadou protein-proteinových interakcí a posttranslačních modifikací, a to fosforylací (zprostředkovanou jinak než Akt/SGT a na jiných residuích), acetylací a ubikvitinací<sup>19</sup>, které ovlivňují jejich lokalizaci v buňce, DNA vazebnou afinitu, a proto i transkripční aktivitu.

### 2.3.1 FOXO4 transkripční faktor

FOXO4 je pro svůj antiproliferativní potenciál, daný schopností zastavit buněčný cyklus v jednotlivých kontrolních bodech, považován za tumorový supresor. Aktivací FOXO4 je zvýšena exprese p130/RBL2 (z angl. Retinoblastoma-like protein 2). Následná tvorba komplexu p130 s transkripčním elongačním faktorem E2F-4 indukuje vstup buněk do klidového stavu (G<sub>0</sub> fáze). FOXO4 dále zvyšuje expresi p27 proteinu, která indukuje zastavení buněčného cyklu v G<sub>1</sub> fázi. Mimo to FOXO4 snižuje expresi cyklin proteinů D1 a D2, které jsou potřebné pro přechod G<sub>1</sub>→S buněčného cyklu<sup>25</sup>. Aktivovaný FOXO4 rovněž indukuje transkripci pro-apoptických genů (kódujících proteiny Bim, Bcl-6, Bax), a tak podporuje apoptózu různých rakovinných buněk, čímž inhibuje invazitu nádoru a tvoření metastáz<sup>25</sup>. Za zmínku stojí taktéž úloha FOXO4 v regulaci angiogeneze, erythropoézy a metabolismu glukózy, tedy v procesích důležitých pro růst nádoru<sup>26</sup>. Zato jinému členu FOXO rodiny, FOXO1, je připisována pro-angiogenní funkce, protože myši s genovým knockoutem FOXO1 zemřely v embryonálním stádiu v důsledku vážně narušeného cévního vývoje<sup>27</sup>.

FOXO4 hraje neméně důležitou roli ve zprostředkování odpovědi na oxidační stres. V přítomnosti reaktivních forem kyslíku je FOXO4 fosforylován na T447 a T451 JNK kinasou (z ang. c-Jun N-terminal kinase) a monoubikvitinován MDM2 (z angl. murine double minute 2), což vede k translokaci do jádra kde prostřednictvím indukce transkripce antioxidantních enzymů, jako je superoxid dismutasa 2 (SOD2) a katalasa podporuje detoxikaci<sup>28</sup>. Jestliže je ale úroveň oxidačního stresu vysoká, pak je FOXO4 naopak inhibován NLK (z angl. Nemo-like kinase) zprostředkovanou fosforylací a simultánní monoubikvitinací. Aktivita a chování FOXO4 je tak různá v závislosti na míře oxidačního stresu<sup>25</sup>.

Nedávné studie však ukazují, že FOXO4 může také vývoj nádoru podporovat. Bylo zjištěno, že zvýšená hladina exprese FOXO4 v reakci na chemoterapeutickou léčbu u B-buněčného lymfomu je spojena se špatnou prognózou<sup>29</sup>. Jak již bylo zmíněno, nízká hladina ROS indukuje aktivaci FOXO4, která následně zvyšuje odolnost vůči oxidačnímu stresu působením SOD2 dismutasy a katalasy, zároveň ale tlumí FOXO4 vyvolanou buněčnou smrt zprostředkovanou Bcl-6 a Bim. Tyto vlastnosti zřejmě podporují vyhýbání se apoptóze při progresi nádoru<sup>25</sup>. Dysregulace FOXO4 se spojuje s rozvojem řady s věkem souvisejících patologií. Předpokládá se, že FOXO4 ovlivňuje Alzheimerovu a Parkinsonovu chorobu tím, že řídí antioxidační kapacitu buněk<sup>30</sup>.

## 2.4 p53 transkripční faktor

Protein p53 je vůbec první objevený přirozeně se vyskytující tumorový supresor. Po jeho objevení v roce 1979 byl však nejdříve klasifikován jako onkogen, v souladu s tehdejšími experimentálními nálezy a paradigmaty<sup>31</sup>. Počátky studia p53 proteinu byly totiž kompromitovány získáním cDNA klonů p53 z transformovaných buněk namísto z normální funkční tkáně, protože p53 se v nádorových buňkách hojně vyskytoval<sup>32</sup>. Nyní je již známo, že u asi poloviny různých typů rakoviny je p53 mutovaný.<sup>33,34</sup> Mutovaný p53 nejenomže ztrácí své tumor supresivní funkce, ale vykazuje i aktivity typické pro onkogeny. Při porovnání DNA sekvence různých klonů bylo zjištěno, že žádné dva klony neměly identickou sekvenci, což vedlo k názoru, že alespoň některé, ne-li všechny klony, nesly mutace<sup>35</sup>. Po naklonování nemutantní myší cDNA p53 bylo ukázáno, že protein postrádá onkogenní aktivitu při pokusu o *in vitro* transformaci buněk<sup>36</sup>. Simultánně bylo demonstrována anti-proliferativní vlastnost wt-p53 (wt = divoký typ, z angl. wild type) inaktivací alelických mutací u lidských nádorů<sup>37</sup>, takže se nakonec změnila klasifikace p53 z onkogenu na tumorový supresor.

Tumor-supresivní aktivitu p53 lze charakterizovat pomocí genů, které jsou přímo kontrolovány p53 transkripčním faktorem. Geny, které p53 kontroluje, lze rozdělit do 4 obsáhlých skupin: 1) geny inhibující progresi buněčného cyklu, 2) geny vedoucí k apoptóze buňky, 3) geny zajišťující opravu poškozené DNA, 4) geny inhibující tvorbu krevních cév<sup>33</sup>.

Klíčovými hráči progresu buněčného cyklu jsou cyklin-dependentní kinasy, které spolu s partnerskými cyklin-proteiny umožňují přechod z G<sub>1</sub> přípravné fáze do S fáze,

v které probíhá replikace DNA. p53 stimuluje expresi genu pro p21 protein, který slouží jako inhibitor cyklin-dependentních kinas a tudíž inhibuje přechod  $G_1 \rightarrow S$ , ale také  $G_2 \rightarrow M$  přechod buněčného cyklu.

Mediátorů p53 indukované apoptózy je mnoho. Jedním z nich je Bax protein, jehož gen má v regulačním místě p53-vazbné místo. Analogické vazebné místo pro p53 u myšáho Bax genu ale chybí<sup>35</sup>. Apoptóza jako prostředek tumorové suprese zamezuje rozšíření poškození v rámci organismu, odstraňuje nebezpečné buňky, které by jinak proliferací mohly vyvolat nádorové onemocnění<sup>38</sup>.

Proteinu p53 je připisována přezdívka „strážce genomu“ mimo jiné proto, že reguluje expresi genů, které slouží k opravám chyb v DNA, čímž napomáhá zachování genetické integrity. Chyby v klíčových genech pro buněčný růst by mohly vyvolat maligní transformaci buněk a rozvoj nádorového onemocnění.

Nádory v pokročilém stádiu vyžadují růst nových krevních cév přinášejících živiny do jejich blízkého okolí. Protein p53 stimuluje expresi genů, které procesu růstu nových cév zabraňují<sup>39</sup>.

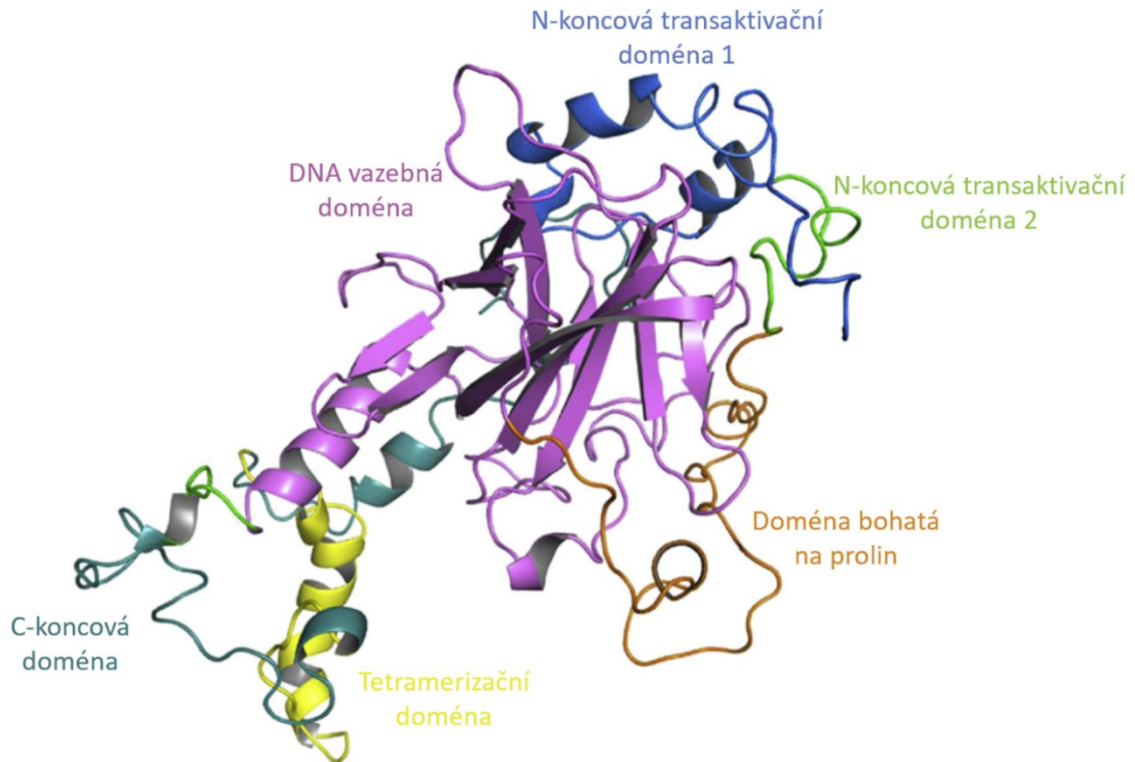
#### 2.4.1 Aktivace a regulace aktivity p53

Aktivace p53 je zejména asociována s poškozením DNA. Poškození DNA je detekováno evolučně zachovanými proteiny (stejně proteiny detekují a signalizují poškození DNA u organismů od kvasinek po člověka). Patří mezi ně DNA-dependentní serin-threoninové kinasy ATM, Chk1 a Chk2. Všechny fosforylují p53 na N-terminální transkripční doméně. Fosforylace na tomto místě znemožňuje vazbu MDM2 (z angl. murine double minute 2) enzymu, který pracuje jako ubiquitin ligasa a přidává sérii ubiquitinů na molekulu p53. Polyubikvitinylovaný p53 podléhá degradaci v proteazomu. Pokud je vazba MDM2 na p53 znemožněna, tak nedochází k degradaci p53 a jeho koncentrace p53 v buňce roste<sup>33</sup>. Aby p53 mohl vykonávat svou funkci transkripčního aktivátoru musí podstoupit konformační změny, které jsou výsledkem dalších posttranslačních modifikací – např. fosforylace/defosforylace a acetylace<sup>40</sup>. Aktivita p53 je dále regulována interakcí p53 s jinými intracelulárními proteiny (vírového původu nebo buňce vlastními). Interakce může způsobit změnu lokalizace proteinu v buňce nebo může pozměnit schopnost p53 vázat DNA, koaktivátory či korepresory, případně může ovlivnit rychlost degradace p53 a tím i časový obrat proteinu<sup>41</sup>.

Aktivace p53 může být dále dosažena, nezávisle na poškození DNA, intenzivní onkogenní signalizací nebo důsledkem jiných buněčných stresorů (např. oxidačního stresu vyvolaného hypoxií)<sup>42</sup>. Tyto způsoby aktivace rovněž nakonec všechny vedou k znemožnění vazby s MDM2 a inhibici degradace p53<sup>40</sup>, který zůstává v buňce ve vysoké koncentraci a po kovalentních modifikacích může sloužit jako regulátor – induktor či represor svých cílových genů. Aktivovaný p53 se na DNA váže jako homotetramer. Sekvence DNA, na které se p53 váže vykazují určitou mírou variability, všechny ale zahrnují dvě za sebou jdoucí sekvence 5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3', kde Pu = purinová báze a Py = pyrimidinová báze<sup>43</sup>. Tetramerizace p53 zvyšuje sílu jednotlivých vazebných interakcí skrze aviditu a je pro regulaci transkripční aktivity klíčová<sup>42</sup>.

#### 2.4.2 Struktura p53

Protein p53 dostal své jméno podle jeho zdánlivé molekulové váhy získané SDS-PAGE analýzou, která ukázala že se jedná o protein o hmotnosti 53 kDa<sup>31</sup>. Skutečná hmotnost proteinu, získaná součtem hmotností aminokyselinových zbytků je však pouze 43,7 kDa. Protein p53 je tvořen řetězcem 393 aminokyselin a je členěn do šesti domén. Těmito doménami jsou dvě transaktivační domény na N-konci (TAD1 a TAD2), doména bohatá na prolin (PRD, z angl. proline rich domain), DNA vazebná doména (DBD), tetramerizační doména (TD) a C-koncová doména<sup>44</sup>. Strukturní model p53 s motivy sekundární struktury a doménovou architekturou je vyobrazen na *Obr. 2.3*, str. 19. N-koncová transaktivační doména se podílí na protein-proteinových interakcích s regulačními proteiny, např. již zmiňovaným MDM2 a dále p300, který napomáhá aktivaci p53 tím, že způsobuje acetylaci v C-koncové oblasti p53<sup>45</sup>. Jiné protein-proteinové interakce zprostředkovává DNA-vazebná doména, která je zároveň nejčastějším místem rakovinotvorných mutací p53<sup>46</sup>. C-koncová část p53 zahrnuje doménu zodpovědnou za tetramerizaci a obsahuje fosforylační a acetylační místa, které ovlivňují schopnost p53 vázat DNA. Navíc k tomu jsou zde obsaženy nukleární lokalizační a exportní sekvence<sup>47</sup>.



**Obrázek 2.3 – Strukturní model p53<sub>(1-393)</sub>.** Doménová struktura je barevně zvýrazněna. Strukturní model byl získán na základě homologního modelování a simulací molekulové dynamiky. Převzato a upraveno<sup>44</sup>.

## 2.5 FOXO4 a p53 při regulaci senescence

Buněčná odpověď po aktivaci FOXO4 a p53 je podobná – oba transkripční faktory mohou vyvolat buď senescenci, nebo apoptózu v závislosti na buněčném typu a závažnosti/typu buněčného stresu. Zastavení buněčného cyklu aktivovaným FOXO4 je primárně zajištěna zvýšenou expresí p27 proteinu, respektive p21 proteinu v případě aktivovaného p53 transkripčního faktoru. Proteiny p27 i p21 patří mezi inhibitory cyklin-dependentních kinas (CDKI, z angl. cyklin-dependent kinase inhibitors) které blokují inaktivaci retinoblastomového proteinu (RB), což vede k aktivaci E2F transkripčních faktorů a k trvalému zastavení buněčného cyklu a indukci senescence. Apoptóza působením FOXO a p53 je řízena převážně zvýšenou expresí proapoptických BH3-proteinů (z Bcl-2 rodiny).<sup>19</sup>

Další důležitou známkou propojení obou proteinů v rámci regulace senescence je přímá interakce p53-FOXO4 *in vitro* a *in vivo*.<sup>42</sup> Bylo ukázáno, že tato interakce potlačuje apoptózu u senescentních buněk, a že inhibice/rozrušení této interakce FOXO4-D-retro-inverso peptidem (FOXO4-DRI), designovaným podle vzoru N-koncové části FOXO4-DBD vedlo ke snížení exprese CDKI p21. Rozrušení interakce navíc vedlo

k translokaci p53 do cytosolu, čímž byla indukována smrt senescentních buněk. U stárnoucích myší byla po aplikování FOXO4-DRI peptidu pozorována zlepšená kondice, hustota srsti a renální funkce.<sup>48</sup>

## 2.6 Vzájemná interakce FOXO a p53

Interakce mezi FOXO a p53 byla nejdříve popsána na FOXO3-p53 komplexu, kde bylo ukázáno, že tvorba komplexu je zodpovědná za aktivaci SIRT1 deacetylasy vyvolanou hladověním<sup>49</sup>. Pozdějším studiem vazebného rozhraní ve snaze o lokalizování hlavních kontaktů interakce tohoto komplexu bylo ukázáno, že DNA-vazebná doména p53 (residua 93-293), slabě interaguje s „winged-helix“ doménou/DBD a C-koncovou transaktivační doménou FOXO3. Rovněž bylo zjištěno, že pro formaci komplexu není p53 potřebný v plné délce (residua 1-393), ale DBD je pro interakci dostačující. „Winged-helix“/DBD doména a C-koncová transaktivační doména je u FOXO podrodiny evolučně konzervována, takže by měla být možná i interakce s ostatními členy (FOXO1, FOXO4, FOXO6).

Další dokumentovanou interakcí FOXO proteinů s p53 je FOXO4-p53. Bylo ukázáno, že přímá interakce mezi těmito proteiny potlačuje apoptózu u senescentních buněk, a že inhibice/rozrušení této interakce peptidem designovaným podle N-koncové části FOXO4-DBD vedlo k narušení transkripce, respektive snížení exprese CDKI p21, který je důležitý regulátor senescence. Rozrušení interakce navíc vede k translokaci p53 do cytosolu, čímž je indukována smrt senescentních buněk<sup>48</sup>.

### 2.6.1 Vazebné rozhraní komplexu FOXO4-p53

Strukturní detaily interakce FOXO proteinů s p53 byly donedávna jen velmi omezeně zdokumentovány. Teprve nedávno byla publikována rozsáhlá studie, která pro zmapování vazebného rozhraní využila několik zkrácených konstruktů jak FOXO4, tak i p53. Charakterizováním vazebné interakce jednotlivých zkrácených konstruktů je možné zjistit, které domény a které nestrukturované oblasti obou proteinů se na interakci mezi proteiny o plné délce podílí. Pro charakterizování interakcí jednotlivých konstruktů bylo užito několik fyzikálně-chemických metod: spektroskopie NMR (nukleární magnetické rezonance), chemické zesílení s hmotnostní spektrometrií (z angl. chemical cross-linking coupled to

mass spektrometry) a metoda sedimentační rychlosti analytické ultracentrifugace (SV AUC, z angl. sedimentation velocity analytical ultracentrifugation)<sup>50</sup>.

Bylo zjištěno, že klíčovými oblastmi FOXO4-p53 komplexu je N-koncová transaktivační doména p53 (obzvláště TAD2), která interaguje s několika segmenty DNA-vazebné domény FOXO4. Vzniku stabilního komplexu napomáhá nestrukturovaná N-koncová oblast FOXO4, která obsahuje konzervovaný region 1 (CR1) a Akt fosforylační místo/vazebné místo pro 14-3-3 protein.

Tvorba komplexu mezi konstrukty p53 a FOXO4, kterým oběma chyběly N-koncové oblasti, nebyla vůbec pozorována. Prvních 60 aminokyselin p53 (obsahující TAD1 a TAD2) je pro tvorbu komplexu nezbytných. N-koncová nestrukturovaná oblast FOXO4 může interagovat s p53 prostřednictvím vysoce heterogenních přechodných kontaktů, které jsou běžně pozorovány v komplexech vnitřně neuspořádaných proteinů, které mohou zůstat ve vázaném stavu nesložené a nabývat více konformací. Podle jiného vysvětlení by odstranění N-koncové části FOXO4 mohlo ovlivnit konformaci FOXO4-DBD, a tím i jeho interakci s p53 TAD. Na stabilizaci komplexu se podílí také nestrukturovaná C-koncová oblast FOXO4. p53 má přispívat ke stabilizaci komplexu FOXO4-p53 doplňkovými kontakty zprostředkovanými doménou bohatou na prolin (PRD) a DNA-vazebnou doménou. Po tvorbě komplexu se DBD obou proteinů dostávají do blízkého kontaktu, čímž by mohla být ovlivněna jejich schopnost vázat DNA. Tato hypotéza byla ve stejné publikaci potvrzena pro p53, u kterého byla pozorována snížená DNA vazebná afinita. Vedle toho u FOXO4 nebyla pozorována výrazná změna v DNA vazebné afinitě. Biologická role FOXO4 zprostředkované inhibice p53 DNA-vazebné afinity dosud není jasná.

## 2.7 Buněčná senescence a stárnutí

Buněčná senescence je jev, při kterém dochází k trvalému zastavení růstu a proliferace buňky v reakci na řadu buněčných stresových faktorů či při dosažení maxima svého replikačního potenciálu. Senescentní buňky (SC, z angl. senescent cells) zůstávají metabolicky aktivní, odolávají apoptóze a jsou typické sekrecí interleukinů, prozánětlivých cytokinů a růstových faktorů, souhrnně sekretují tzv. fenotyp související se senescentními buňky (SASP, z angl. senescence-associated secretory phenotype).

S rostoucím věkem se SC v těle akumuluje, a chronická produkce SASP do okolí senescentních buněk přináší řadu nežádoucích účinků na buněčné mikroprostředí a tkáňovou

funkci. Akumulace SC je považována za jednu z hlavních příčin stárnutí a rozvoje s věkem spojených patologií. Senescence může být vyvolána řadou faktorů, k nimž patří zkrácení telomer, oxidační stres a onkogenní signalizace. Oběma transkripčním faktorům p53 a FOXO4 se připisuje ústřední role ve stárnutí. Špatná regulace těchto proteinů je spojena s několika s věkem souvisejícími patologiemi včetně neurogenerativních onemocnění<sup>51,52</sup> a rakoviny.

Několik studií na laboratorních zvířatech ukázalo, že odstranění senescentních buněk obnovuje tkáňovou homeostázu či úspěšně oddaluje progresi poruch spojených se stárnutím<sup>48,53</sup>. Tyto studie otevřely dveře pro vyvinutí látek, které by specificky zabíjely senescentní buňky, a to ve snaze nejenom o oddálení a zmírnění důsledků stárnutí, ale také pro léčbu/obnovení již poškozené tkáně (např. po akutním poškození způsobeným chemoterapeutiky nebo po chronickém poškození způsobeném přirozeným stárnutím). Látky, které jsou schopny specificky zabít senescentní buňky nazýváme senolytika. Vedle senolytik rozlišujeme také senostatika, které představují druhý terapeutický přístup k zaměřování senescentních buněk. Senostatika jsou látky, které modulují/potlačují nebezpečný sekreční fenotyp, aniž by indukovaly smrt buňky<sup>54</sup>.

## 2.8 Senolytika

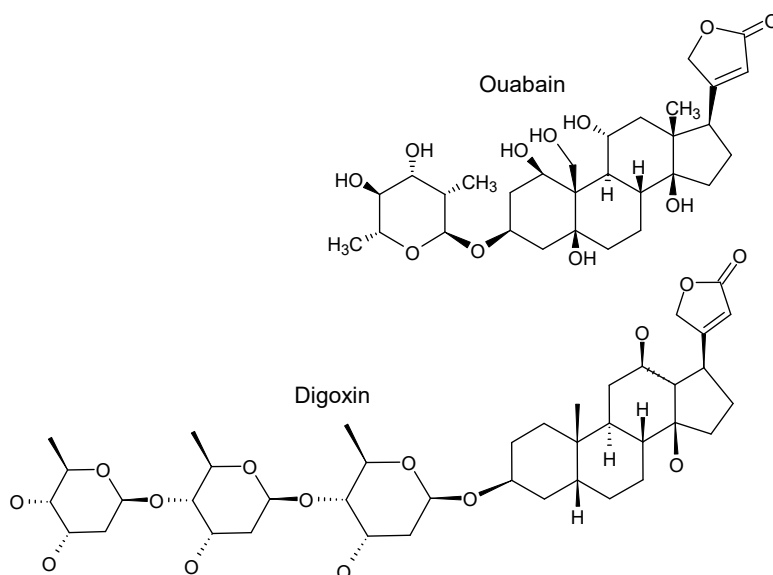
První předběžné studie senolytik svědčí o tom, že snižují počet senescentních buněk, tlumí zánět a zlepšují kondici organismu. Klinické studie identifikovaných senolytik teprve začínají nebo už probíhají. Dosud identifikovaná senolytika se testují např. na léčbu diabetu, idiopatické plicní fibrózy, Alzheimerovy choroby, covidu-19, osteoartritidy, osteoporózy a očních onemocnění. Dokud takové studie nebudou dokončeny, je příliš brzy na to, aby se senolytika používala v klinické praxi<sup>55</sup>. Níže je uvedeno několik příkladů známých senolytik, ani zdaleka se však nejedná o kompletní výčet. Senolytika jsou pro účely této práce rozdělena do několika skupin, a to zejména podle odlišných anti-apoptózních drah senescentních buněk, tzv. SCAP (z angl. senescent cells anti-aptotic pathways)<sup>56</sup>, na které senolytika cílí.

**Inhibitory Bcl-2 rodiny proteinů:** Bcl-2 proteiny sehrávají důležitou roli při apoptóze. Rodina Bcl-2 proteinů sestává ze členů, které buď apoptózu podporují (pro-apoptické Bcl-2), nebo inhibují (pro-apoptické Bcl-2). Pro-apoptické Bcl-2 proteiny zvyšují propustnost



kódujících např. pro-apoptické proteiny PUMA a NOXA z Bcl-2 rodiny, nebo způsobem nezávislým na transkripci – translokací do cytosolu a inhibicí Bcl-xL<sup>60</sup>.

**Srdeční glykosidy:** V roce 2019 byla identifikována nová třída senolytik – srdeční glykosidy (CG, z angl. *cardiac glykosides*). Srdeční glykosidy se přirozeně vyskytují v rostlinách, především v náprstnících. Jedná se o léčiva užívána při srdečním selhání nebo při srdeční arytmií<sup>61</sup>. Mechanismus jejich působení jakožto senolytik je částečně založen na inhibici  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasy, což vede k depolarizaci plasmatické membrány a pozdější acidifikaci buňky z důvodu blokace  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportéru, tím je buňka senzibilizována ke smrti. Specifita vůči senescentním buňkám je zajištěna tím, že SC vykazují mírnou depolarizaci plasmatické membrány již před inhibicí  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasou, a jsou tak náchylnější na působení CG<sup>62</sup>. Mezi CG patří např. látky digoxin a ouabain, viz *Obr. 2.5*.

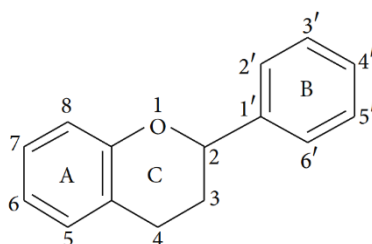


**Obrázek 2.5 – Srdeční glykosidy Digoxin a Ouabain.** Vytvořeno v ACD/ChemSketch.

**Galaktózou modifikované proléčiva:** K vývoji nových senolytik se využívá také metabolických změn SC. Běžnou charakteristikou SC je jejich zvýšená lysosomální  $\beta$ -galaktosidasová aktivita. SA- $\beta$ -galaktosidasa (SA- $\beta$ -gal, z angl. *senescence associated  $\beta$ -galactosidase*) je důležitým biomarkerem senescence, neboť SC mají zvýšenou expresi tohoto enzymu.  $\beta$ -galaktosidasa štěpí terminální  $\beta$ -galaktosu glykokonjugátů. Toho se dá využít připojením galaktózy k různým cytotoxickým sloučeninám. Galaktózou modifikované proléčiva jsou přednostně zpracovány enzymatickým štěpením SA- $\beta$ -gal v senescentních buňkách, což vede k uvolnění aktivních cytotoxických sloučenin a selektivnímu usmrcení senescentních buněk<sup>56</sup>.

Příkladem galaktózou modifikovaného proléčiva je Nav-Gal, který je složený z acetylované galaktózy konjugované k Bcl-2 inhibitoru Navitoclaxu. Ve srovnání se samotným Navitoclaxem, byla u Nav-Gal pozorována snížená trombocytická toxicita, která je při jeho užívání častým vedlejším účinkem<sup>63</sup>.

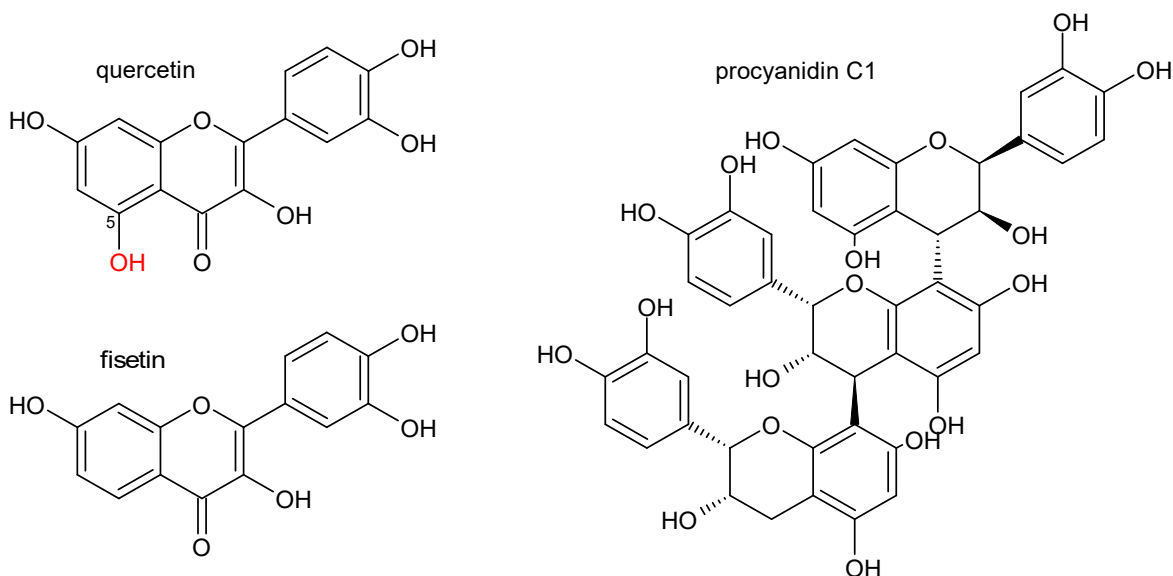
**Flavonoidy:** Poslední zde uvedenou třídou senolytik je skupina flavonoidů. Flavonoidy jsou látky přírodního původu. Jedná se o rostlinné sekundární metabolity s rozličnou polyfenolickou strukturou. Základní skelet flavonoidů tvoří flavonové jádro (viz Obr. 2.6), sestávající z dvou benzenových jader (A a B), které jsou propojeny heterocyklickým pyranem (C). Flavonové jádro je běžně substituované hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami, takže se různé flavonoidy liší stupněm substituce a oxidace<sup>64</sup>. Flavonoidy jsou známy pro své všestranné zdravotní přínosy na lidský organismus, zvláště díky jejich antioxidačnímu působení a kladnému vlivu na cévy. Lidé flavonoidy přijímají ve stravě, hlavními zdroji flavonoidů pro člověka jsou ovoce a zelenina spolu s čajem a červeným vínem<sup>65</sup>.



Obrázek 2.6 – Flavonové jádro tvořící základní skelet flavonoidů. Převzato<sup>64</sup>.

Mezi vůbec první identifikované látky se senolytickou aktivitou *in vitro* a *in vivo* patřil právě flavonoid quercetin (viz Obr. 2.7, str. 26), který také patří mezi inhibitory anti-apoptických Bcl-2 proteinů a inhibuje PI3K/Akt signální dráhu, která bývá nadměrně aktivní u některých typů rakovin<sup>66</sup>. Z buněčných screeningů vyplynuly další flavonoidy se senolytickou aktivitou, např. fisetin (viz Obr. 2.7, str. 26), který je strukturální analog quercetinu, chybí mu pouze 5-hydroxy skupina, přičemž je více účinný než quercetin, což naznačuje, že strukturální optimalizací lze vyvinout účinnější analogy již identifikovaných senolytik. V praxi se provede několik kol studií vztahu mezi strukturou a aktivitou (SAR, z angl. structure-activity relationship), kde jsou malé knihovny analogů testovány na senolytickou aktivitu v senescentní buněčné kultuře<sup>56</sup>. Medicinální chemie bere v potaz i další důležité vlastnosti látek, jako je lepší biologická dostupnost, vhodný biologický

poločas nebo mírnější vedlejší účinky, které do jisté míry předurčují jejich potenciál jako léčiva.



**Obrázek 2.7. Flavonoidy** – přírodní polyfenoly quercetin, fisetin a procyanidin C1. Vytvořeno v ACD/ChemSketch.

Velmi dobré výsledky na myších modelech byly pozorovány také při přerušovaném podávání flavonoidu procyanidinu C1 (PCC1) (viz *Obr. 2.7*), nalezeném v extraktu z hroznových semínek. Přerušované podávání senolytik má potenciál snížit riziko vzniku nežádoucích stavů u pacientů, minimalizovat vedlejší účinky podávaného léčiva a zabránit vzniku lékové rezistence senescentních buněk. U přirozeně stárnoucích myši, kterým byla podávána dávka PCC1 jednou za dva týdny, počínaje věkem 24–27 měsíců (to zhruba odpovídá věku 75–90 u lidí), byla pozorována o 64,2 % delší střední délka života, respektive o 9,4 % delší celková délka života oproti kontrolní skupině. Tato data naznačují, že PCC1 může významně snížit riziko úmrtnosti související s věkem u starých myši<sup>67</sup>.

### 3 Cíle práce

1. Příprava rekombinantní DNA-vazebné domény lidského transkripčního faktoru FOXO4<sub>(86-211)</sub> s mutací T134 → C134.
2. Chemická modifikace připraveného FOXO4-DBD<sub>(86-211)</sub> proteinu v poloze C134 radikálem 3-(2-Iodoacetamido)-PROXYL.
3. Naměření 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spekter <sup>15</sup>N izotopově značeného p53<sub>(1-93)</sub> v přítomnosti FOXO4-DBD<sub>(86-211)</sub> modifikovaného:
  - a) Paramagnetickým radikálem 3-(2-Iodoacetamido)-PROXYL (měření I.)
  - b) Diamagnetickým redukováným radikálem 3-(2-Iodoacetamido)-PROXYL (měření II.)
4. Vyhodnocení získaných dat.

## 4 Materiál

### 4.1 Použité chemikálie

|  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| 1,4-dithiotreitol (DTT) .....                          | Carl Roth Gmbh & Co. Kg (Německo)    |
| 3-(2-Iodoacetamido)-PROXYL .....                       | Sigma-Aldrich Corporation (USA)      |
| ampicilin .....  | Sigma-Aldrich Corporation (USA)      |
| azid sodný .....                                       | PENTA (Česká republika)              |
| $\beta$ -merkapt ethanol .....                         | Carl Roth Gmbh & Co. Kg (Německo)    |
| 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)      |
| glycerol .....   | Carl Roth Gmbh & Co. Kg (Německo)    |
| glycin .....   | Carl Roth Gmbh & Co. Kg (Německo)    |
| hydroxid sodný .....                                   | PENTA (Česká republika)              |
| 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- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) .... | EMD Biosciences, Inc. (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)      |
| Rotiphorese Gel 30 .....                               | Carl Roth Gmbh & Co. Kg (Německo)    |
| sírán nikelnatý .....                                  | PENTA (Česká republika)              |
| TEMED .....  | Carl Roth Gmbh & Co. Kg (Německo)    |
| tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) .....            | Carl Roth Gmbh & Co. Kg (Německo)    |
| trombin .....  | Sigma-Aldrich Corporation (USA)      |

## 4.2 Použité přístroje

|   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| analytické váhy ABS 120-4 .....                             | KERN & SOHN (Německo)                |
| ÄKTAprime .....   | GE Healthcare (USA)                  |
| Bruker Avance III <sup>TM</sup> HD 850 MHz spectrometer ... | Bruker (USA)                         |
| 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)   |
| inkubátor HT Multitron .....                                | Infors (Švýcarsko)                   |
| Millipore Elix .....  | Sigma-Aldrich Corporation (USA)      |
| 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)            |
| zdroj pro elektroforézu .....                               | Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)     |

## 4.3 Ostatní pomůcky

|  |  |
|--|--|
| aparatura pro vertikální elektroforézu .....                       | Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)                     |
| automatické pipety .....   | Eppendorf AG (Německo)                               |
| dialyzační membrána Spectra/Por .....                              | SERVA Electrophoresis GmbH (Německo)                 |
| E.coli kmen BL21(DE3) .....  | Stratagene Corporation (USA)                         |
| filtry o pórovitosti 0,45 µm .....                                 | GE Healthcare (USA)                                  |
| koncentrátory VIVASPIN TURBO 15 .....                              | Sartorius Lab Instruments GmbH & Co.<br>KG (Německo) |
| Chelating Sepharose Fast Flow.....                                 | GE Healthcare (Švédsko)                              |
| injekční stříkačky .....   | B. Braun Melsungen AG (Německo)                      |
| kolona HiLoad <sup>TM</sup> 26/600 Superdex <sup>TM</sup> 75 pg .. | GE Healthcare (USA)                                  |

|                                     |                                      |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| kolona HiTrap SP .....              | GE Healthcare (Švýcarsko)            |
| křemenné kyvety .....               | Agilent technologies, Inc. (USA)     |
| svorky na dialyzační membrány ..... | SERVA Electrophoresis GmbH (Německo) |
| plastové zkumavky .....             | Thermo Fisher Scientific, Inc. (USA) |
| mikrodestičky Corning® 384 .....    | Sigma-Aldrich Corporation (USA)      |
| 5mm Shigemi kyveta .....            | SHIGEMI Co., LTD. (Japonsko)         |

## 5 Metody

Experimentální část této práce sestávala z kultivace transformovaných kompetentních buněk *E. coli*, následné exprese a purifikace DBD potřebného mutantního proteinu FOXO4<sub>(86-211)</sub> (T134C), jež byl poté chemicky modifikován radikálem 3-(2-Iodoacetamido)-PROXYL („paramagnetickou sondou“). Radikálem značený FOXO4<sub>(86-211)</sub> byl přidán ke vzorku <sup>15</sup>N značeného p53<sub>(1-93)</sub> proteinu a provedly se dvě NMR měření, kterými byly získány dvě <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spektra p53<sub>(1-93)</sub> proteinu. Při prvním měření bylo získané spektrum ovlivněno jevem paramagnetického zesílení relaxace. Před druhým měřením byl radikál 3-(2-Iodoacetoamid)-PROXYL redukován kyselinou askorbovou, takže získané spektrum nebylo ovlivněno jevem paramagnetického zesílení relaxace. V této kapitole bude uveden princip a způsob provedení jednotlivých použitých metod.

### 5.1 Exprese DBD mutantního proteinu FOXO4 (T134C)

Rekombinantní proteiny jsou proteiny exprimované v exogenním hostitelském systému. Jejich příprava spočívá ve vpravení expresního vektoru (nejčastěji cDNA plasmid) do hostitelského systému. Proces přijetí cizorodé genetické informace určitým organismem se nazývá transformace. Expresní vektor musí obsahovat minimálně sekvenci promotoru, dále sekvenci pro expresi chtěného proteinu (příslušný gen) a v neposlední řadě selekční marker (tj. gen, který propůjčuje hostitelskému systému vlastnost pro umělou selekci). Jako selekční marker často slouží geny s antibiotikovou rezistencí. Po zavedení vektoru do bakteriální buňky se následně kultura pěstuje na médiu obsahující antibiotikum, takže je zajištěno, že mohou růst pouze ty bakteriální kolonie, které úspěšně přijaly a exprimovaly zavedený genetický materiál.

Jako exogenní hostitelský systém byl pro exprimování mutantního proteinu FOXO4<sub>86-211</sub>(T134C) použit kmen BL21(DE3) bakterie *E. coli*. Jedná se o kmen kompetentních buněk vhodný k provedení transformace. Expresním vektorem byl plasmid pET-15b, který obsahoval gen rezistence proti ampicilinu. Samotný FOXO4-DBD byl exprimován jako fúzní protein s histidinovou kotvou na N-konci a záměnou v jedné aminokyselině v poloze 134 (threonin → cystein).

**Založení bakteriálních kultur:** Do 2 skleněných zkumavek obsahujících 5 ml Luria-Bertani média (LB) bylo za sterilních podmínek napipetováno 5 µl ampicilinu o koncentraci

100 mg/ml. Do každé zkumavky bylo přidáno 5  $\mu$ l roztoku buněčné kultury v glycerolu (zásobní roztok glycerol:buněčná kultura byl v objemovém poměru 3:7). Zkumavky, uzavřené kovovými víčky, byly přes noc ponechány inkubovat při teplotě 37 °C ve stolním orbitálním inkubátoru při 180 ot./min.

Po 16 hodinách byly buněčné kultury za sterilních podmínek sjednoceny v kónické zkumavce a roztok kultury byl rovnoměrně rozdělen do dvou 2l Erlenmeyerových baněk obsahujících 900 ml sterilního LB média s přísadkou ampicilinu o koncentraci 100  $\mu$ g/ml. Buněčné kultury byly znovu inkubovány při teplotě 37 °C v orbitálním inkubátoru při 190 ot./min. V průběhu inkubace byla měřena optická hustota roztoku při vlnové délce 600 nm. Nulová optická hustota byla kalibrována na čisté LB médium. Při  $OD_{600} = 0,4 \text{ cm}^{-1}$  byla teplota snížena na 20 °C a při  $OD_{600} = 0,8 \text{ cm}^{-1}$  (po asi 3,5 hodinách inkubace) byla exprese proteinu indukována použitím IPTG o výsledné koncentraci 0,5mM. Po 17 hodinách exprese prováděné při 20 °C byly buněčné kultury sedimentovány v centrifuze při 4 °C a 2073 $\times$ g. Sediment z 900ml buněčné kultury byl resuspendován v 30 ml lyzačního pufru (složení viz *Tabulka 1*) a zamražen při -80 °C. Složení zásobního (10x koncentrovaného) fosfátového pufru použitého k přípravě lyzačního pufru je uvedeno v *Tabulce 2*.

**Tabulka 1: Složení lyzačního pufru, 300 ml**

| Chemikálie                           | Výsledná koncentrace            |
|--------------------------------------|---------------------------------|
| 10x PBS (složení viz <i>Tab. 2</i> ) | 1x PBS                          |
| NaCl                                 | 1 mol $\cdot$ dm <sup>-3</sup>  |
| $\beta$ ME                           | 4 mmol $\cdot$ dm <sup>-3</sup> |
| Imidazol                             | 2 mmol $\cdot$ dm <sup>-3</sup> |

**Tabulka 2: Složení 10x koncentrovaného PBS pufru (pH = 7,4), 1 l**

| Chemikálie                                   | Odměřené množství |
|--|-------------------|
| NaCl   | 80 g              |
| KCl  | 2 g               |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>              | 2,4 g             |
| NaHPO <sub>4</sub> $\cdot$ 2H <sub>2</sub> O | 14,4 g            |
| NaN <sub>3</sub>                             | 0,4 g             |

## 5.2 Lyze buněk

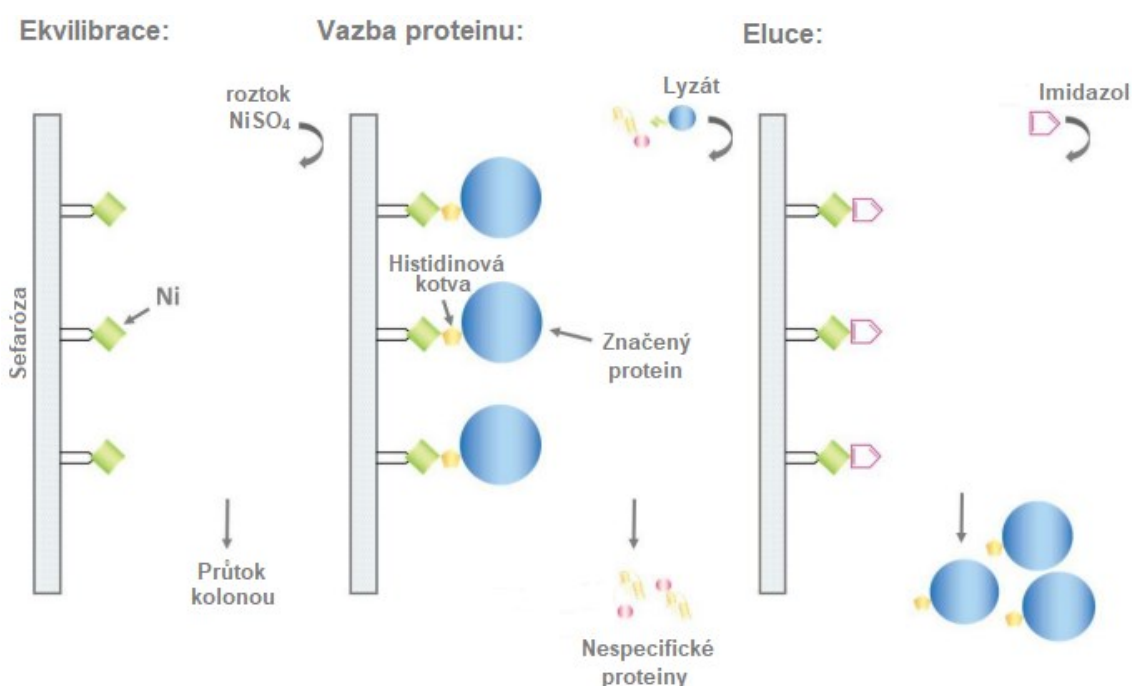
Aby bylo možné exprimovaný protein izolovat, je nutné rozrušit buněčnou stěnu *E. coli*. Rozrušení buněčné stěny *E. coli* bylo docíleno působením lysozymu na resuspendovanou buněčnou kulturu. Lyze buněk byla dokončena sonikací. Sonikace je využití ultrazvukových pulsů k narušení plasmatické membrány buněk a k vylití buněčného obsahu do roztoku. Při sonikaci se uvolňuje značné množství tepla, a proto je nutné během sonikace teplo z roztoku buněk efektivně odvádět. Jedním ze způsobů provedení sonikace v laboratoři je přímé ponoření ultrazvukové sondy do sonikovaného roztoku v kádince, která je chlazená v ledové lázni.

**Provedení:** Resuspendovaný roztok buněk, zamražený při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , byl ponechán rozmraznout při pokojové teplotě. Roztok buněk byl převeden do silnostěnné kádinky PYREX a byl k němu přidán lysozym (enzym narušující buněčnou stěnu bakterií) o výsledné koncentraci  $0,1\text{ mg/ml}$ . Roztok byl ponechán inkubovat po dobu 35 minut při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  za stálého míchání. Poté byl přidán PMSF (fenylmethylsulfonylfluorid) o výsledné koncentraci  $1\text{ mM}$ , který slouží jako inhibitor serinových proteáz. PMSF je třeba přidávat těsně před sonikací, neboť je ve vodě nestabilní, jeho poločas života činí méně než 1 h a přidává se proto, aby nedošlo při lýzi buněk zároveň k degradaci žádaného proteinu. Takto připravený roztok byl ponořen do ledové lázně a sonikován při výkonu 55 wattů za opakování cyklu ultrazvukových pulsů po dobu 15 sekund následovaných 45 sekundovou pauzou. Celkový čas trvání pulzu byl 15 minut. Sonikát byl následně centrifugován při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $20\ 000\times g$  po dobu 45 minut.

## 5.3 Niklová chelatační chromatografie

Niklová chelatační chromatografie patří mezi afinitní chromatografie, u kterých je separace umožněna na základě navázaných skupin na stacionární fázi (matrice), interagujících pouze s určitým strukturním typem molekul vzorku. Matrice Chelating Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow umožňuje imobilizaci iontu  $\text{Ni}^{2+}$ . Matrice nabitá nikelnatými ionty pak specificky tvoří komplexy s dusíkem na postranním řetězci aminokyseliny histidinu. Při průchodu vzorku kolonou se selektivně zachycují především proteiny označené histidinovou afinitní kotvou. Histidinovou kotvu tvoří sekvence nejčastěji 6 aminokyselin histidinu navázaných buď na C- nebo N-konci proteinu. Exprimovaný FOXO4 protein na rozdíl od jiných proteinů v buněčném extraktu bude mít tuto histidinovou kotvu (na N-konci), která

umožní jeho zachycení, zatímco ostatní proteiny buněčného extraktu by měly kolonou procházet bez zachycení. Eluci zachyceného proteinu je možné provést více způsoby: a) snížením pH (při kyselém pH bude aminoskupina na postranním řetězci protonizovaná a ztratí schopnost vázat  $\text{Ni}^{2+}$ ), b) nadbytkem imidazolu (také afinitně váže  $\text{Ni}^{2+}$  do komplexu, jde o tzv. kompetitivní eluci), c) chelatačními činidly (např. EDTA, která uvolní imobilizovaný kov z matrice, dochází k tzv. koeluci proteinu). Při niklové chelatační chromatografii v této práci byla použita eluce nadbytkem imidazolu. Průběh niklové chelatační chromatografie je schematicky znázorněn na *Obrázku 5.1*.



**Obrázek 5.1** – Schéma průběhu niklové chelatační chromatografie. Převzato a upraveno<sup>68</sup>.

**Provedení:** Kolona naplněná 5 ml Chelating Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow byla připojena k peristaltické pumpě a nejprve promyta 15 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ . Nabití kolony bylo provedeno 60 ml 0,1 M  $\text{NiSO}_4$ . Nenavázaný  $\text{Ni}^{2+}$  byl vymyt opět 15 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ . Poté byla kolona promyta 15 ml pufru E, jehož složení je uvedeno v *Tabulce 3*, str. 35. Následovala adsorpce supernatantu buněčného extraktu na kolonu a poté se začalo promývat pufrům E (celkem 50 ml) a 10 % (v/v) pufrům F (složení v *Tabulce 4*, str. 35) v pufru E. Adsorpce supernatantu a následné promývání pufrů bylo prováděno připojením kolony k peristaltické pumpě s nastaveným průtokem asi 1 ml/min. Následně byla peristaltická pumpa odpojena a fúzní protein byl eluován 20 ml čistého pufru F a sbírán po 1,5 ml frakcích do zkumavek inkubovaných na ledu. Výsledek separačního procesu byl ověřen pomocí denaturující

elektroforézy v 15% polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE). Frakce, které vykazovaly dostačující koncentraci fúzního proteinu byly sjednoceny pro další kroky purifikace.

**Tabulka 3: Složení pufru E, 500 ml**

| Chemikálie                                    | Výsledná koncentrace     |
|---|--------------------------|
| 10x PBS (složení viz <i>Tab. 2</i> , str. 32) | 1x PBS                   |
| NaCl  | 0,5 mol·dm <sup>-3</sup> |
| βME   | 2 mmol·dm <sup>-3</sup>  |
| Imidazol                                      | 1 mmol·dm <sup>-3</sup>  |

**Tabulka 4: Složení pufru F, 100 ml (pH upraveno na 8,0)**

| Chemikálie                                    | Výsledná koncentrace     |
|---|--------------------------|
| 10x PBS (složení viz <i>Tab. 2</i> , str. 32) | 1x PBS                   |
| NaCl  | 0,5 mol·dm <sup>-3</sup> |
| βME   | 2 mmol·dm <sup>-3</sup>  |
| Imidazol                                      | 0,6 mol·dm <sup>-3</sup> |

## 5.4 Dialýza a štěpení His-tag

Dialýza je běžnou technikou pro výměnu pufru z roztoků biologických makromolekul. Dialýza je přitom založena na jevu osmózy – samovolného průchodu rozpouštědla do roztoku odděleného polopropustnou membránou. Polopropustná membrána umožňuje průchod pouze nízkomolekulárních látek – složek pufrů, které přechází z prostředí o vyšší koncentraci do prostředí s nižší koncentrací. Po niklové afinitní chromatografii bylo potřeba odstranit především sůl, imidazol a Ni<sup>2+</sup>.

**Provedení:** Sjednocené frakce eluovaného proteinu byly přemístěny do dialyzační membrány s póry propustnými pro molekuly do molekulové hmotnosti 6-8 kDa a byla provedena dialýza při 4 °C proti pufru A (složení viz *Tabulka 5*, str. 36). Po 1 h byla na základě Lambert-Beerova zákona (5.1) stanovena koncentrace proteinu,  $c$ , v dialyzační membráně měřením absorbance,  $A$ , při vlnové délce 280 nm ( $\epsilon$  je molární absorpční koeficient a  $l$  délka absorpční vrstvy).

$$c = \frac{A_{280}}{\epsilon_{280} \cdot l} \quad (5.1)$$

Ze zjištěné koncentrace byl vypočten výtěžek purifikace před štěpením dle vztahu

$$m = V \cdot c \cdot M \quad (5.2)$$

kde  $m$  je hmotnost proteinu v g,  $V$  objem roztoku proteinu v  $\text{dm}^3$ ,  $c$  koncentrace proteinu v  $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a  $M$  molární hmotnost v  $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Ke kvantitativnímu odštěpení histidinové kotvy bylo použito 10 U trombinu na 1 mg fúzního proteinu (1 U odpovídá 1  $\mu\text{l}$  roztoku). Štěpení probíhalo během dialýzy přes noc při 4 °C za stálého míchání. Výsledek štěpení byl ověřen metodou SDS-PAGE.

**Tabulka 5: Složení pufru A, 1 l (pH upraveno na 6,3)**

| Chemikálie         | Výsledná koncentrace                  |
|--------------------|---------------------------------------|
| kyselina citrónová | 50 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ |
| EDTA               | 2 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  |
| $\beta$ ME         | 2 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  |

## 5.5 Kationtově výměnná chromatografie

U iontově výměnné chromatografie nese stacionární fáze (pevný nosič) na svém povrchu nabitě funkční skupiny, které se chovají jako iontoměniče. Na povrch stacionární fáze se váží elektrostatickou interakcí ty složky vzorku, které nesou opačný náboj. Síla interakce je závislá na iontové síle a pH protékající mobilní fáze. Jestliže má roztok proteinu pH nižší než je jeho pI, pak protein ponese kladný náboj a bude se vázat na záporně nabitě funkční skupiny nosiče. Eluce zachyceného proteinu může být dosažena změnou pH mobilní fáze (tzn. změnou náboje proteinu) nebo gradientem soli, čímž dojde k zvýšení iontové síly a snížení elektrostatické interakce proteinu s iontoměničem.

**Provedení:** Po dialýze byl roztok proteinu přenesen z dialyzační membrány do kónické zkumavky inkubované na ledu. Kolona HiTrap SP, naplněná stacionární fází sefárovou, nesoucí záporně nabitě sulfopropylové skupiny, byla připojena k přístroji ÄKTAprime. Objem kolony činil 4 ml. Před zavedením vzorku na kolonu byl celý obvod přístroje promyt 3 CV (z angl. *column volume*) pufru F (složení viz *Tabulka 6*, str. 37) a 1 CV pufru E (složení viz *Tabulka 7*, str. 37) přefiltrovanými přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$ . Taktéž roztok proteinu byl přefiltrován přes membránový filtr s velikostí pórů 0,45  $\mu\text{m}$ . Rychlost průtoku byla nastavena na 1,5 ml/min a při této rychlosti byl přidán roztok proteinu.

Eluce proteinu byla provedena gradientem pufru F. Frakce byly jímány do mikrotitrační destičky po 1 ml. Průběh chromatografie byl sledován měřením měrné elektrické vodivosti a absorbance při 280 nm v ústí kolony. Metodou SDS-PAGE byla ověřena čistota sbíraných frakcí.

**Tabulka 6: Složení pufru F, 500 ml**

| Chemikálie         | Výsledná koncentrace     |
|--------------------|--------------------------|
| kyselina citrónová | 1x PBS                   |
| EDTA               | 0,5 mol·dm <sup>-3</sup> |
| DTT                | 2 mmol·dm <sup>-3</sup>  |
| NaCl               | 1 mol·dm <sup>-3</sup>   |

**Tabulka 7: Složení pufru E, 500 ml**

| Chemikálie         | Výsledná koncentrace     |
|--------------------|--------------------------|
| kyselina citrónová | 1x PBS                   |
| EDTA               | 0,5 mol·dm <sup>-3</sup> |
| DTT                | 2 mmol·dm <sup>-3</sup>  |

## 5.6 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie umožňuje separaci proteinů popřípadě nukleových kyselin podle jejich velikostí. Je založena na pronikání analyzovaných látek do porézního dělicího materiálu (gelu). Gel je zesíťovaný polymer (například dextran) s trojrozměrnou strukturou s póry o určité velikosti. Mobilní fáze je roztok mezi částicemi gelu a stacionární fáze tvoří polymerní gel. Molekuly větší velikosti než je velikost pórů nemohou pronikat do částic gelu a pouze částice gelu obtékají. Menší molekuly mohou pronikat do částic gelu, tím jsou zadržovány, prodlužuje se jejich dráha průchodu chromatografickou kolonou, a jsou tak odděleny od větších molekul. Nízkomolekulární látky, například anorganické soli jsou zadržovány v gelu nejméně a eluovány nejpozději.

**Provedení:** Gelové permeační chromatografii předcházela ultrafiltrace roztoku proteinu v centrifuze při 1500×g a teplotě 4°C. Tímto procesem byl roztok proteinu koncentrován na konečný objem 1,5 ml. Byl použit koncentrátor s membránou propustnou pro molekuly o molekulové hmotnosti nižší než 10 000 Da. Gelová chromatografie byla provedena na koloně HiLoad™ 26/600 Superdex™ 75 pg. Jako mobilní fáze byl použit 20mM Tris pufr o pH 7,5 (složení viz *Tabulka 8*, str. 38) o průtoku 2 ml/min. Frakce byly jímány do

mikrotitrační destičky po 1,5 ml. Výsledek separačního procesu posledního kroku purifikace proteinu byl ověřen metodou SDS-PAGE.

**Tabulka 8: Složení pufru použitého v gelové permeační chromatografii jako mobilní fáze**

| Chemikálie      | Výsledná koncentrace |
|-----------------|----------------------|
| Tris (pH = 7,5) | 20 mM                |
| NaCl            | 100 mM               |
| glycerol        | 10% (v/v)            |
| EDTA            | 1 mM                 |
| DTT             | 2 mM                 |

## 5.7 SDS-PAGE

SDS-PAGE (z angl. sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis) je separační metoda využívaná k separaci proteinů na základě jejich odlišné molekulové hmotnosti. Oproti jiným elektroforetickým metodám, u kterých jsou látky děleny na základě obecné elektroforetické pohyblivosti (ta je závislá mimo jiné také na tvaru a velikosti náboje na jednotku hmoty) je u SDS-PAGE dělicí proces zajištěn převážně na základě rozdílné molekulové hmotnosti. Dodecylsírán sodný je iontová povrchově aktivní látka sloužící jako detergent, proteiny denaturuje a udílí jim uniformní záporný náboj, který překrývá vlastní náboj proteinu. Všechny proteiny pokryté SDS jsou charakteristické podobným válcovitým tvarem.

Polyakrylamidový gel vzniká kopolymerační reakcí akrylamidu a N,N'-metylenbis(akrylamidu) v roztoku pufru a za přítomnosti iniciátoru a stabilizátoru. Jako iniciátor slouží persulfát amonný, který se za světla rozkládá za vzniku volných radikálů, které iniciují vlastní polymerační reakci. Volné radikály jsou stabilizovány přidaným tetramethylethyldiaminem (zkráceně „TEMED“). Struktura vzniklého gelu sestává z pórů určité velikosti, obsahujících kapalinu s pufrém. Velikost póru je nepřímo úměrná koncentraci bis-akrylamidové složky. Pokud je velikost pórů srovnatelná s velikostí proteinů, pak se proteiny budou při průchodu gelu setkávat s odporem. Na rozdíl od gelové permeační chromatografie se větší molekuly zpozdí oproti menším molekulám, jelikož je pro ně odpor prostředí větší.

Pro potřeby této práce byla SDS-PAGE použita jako kontrolní metoda k ověření přítomnosti purifikovaného proteinu po provedení jednotlivých purifikačních kroků. SDS-PAGE bylo využito po níkové afinitní chromatografii, po kationově výměnné

chromatografii a po gelové permeační chromatografii a také pro ověření odštěpení Histidinové kotvy po štěpení trombinem.

**Provedení:** Z vybraných frakcí po jednotlivých purifikačních krocích bylo odebráno 10  $\mu$ l roztoku proteinu a smícháno s 5  $\mu$ l 5 $\times$ SDS vzorkového pufru (složení viz *Tabulka 9*). Přípravené vzorky byly inkubovány při 95  $^{\circ}$ C po dobu tří minut a poté byly převedeny do jamek zaváděcího gelu (4% polyakrylamidový gel, složení viz *Tabulka 10*), kterým byl převrstven 15% separační polyakrylamidový gel (*Tabulka 11*, str. 40). Jako marker molekulových hmotností byl použit ROTI<sup>®</sup>Mark TRICOLOR, který sestává z deseti proteinů v rozmezí molekulových hmotností 11-245 kDa. Elektroforéza probíhala v 1 $\times$ koncentrovaném pufru pro SDS elektroforézu (složení 10 $\times$ koncentrovaného pufru viz *Tabulka 13*, str. 40) při konstantním napětí 200 V po dobu 60 minut. Pro vizualizaci proteinů zachycených na gelu po elektroforéze bylo použito barvivo Comassie Brilliant Blue G-250 (složení barvicího roztoku viz *Tabulka 14*, str. 40). Gel byl přiveden k varu v asi 200 ml deionizované vody, poté krátce povařen v přítomnosti barviva Comassie. Posledním krokem bylo odbarvení gelu v deionizované vodě.

**Tabulka 9: Složení 5 $\times$ SDS vzorkového pufru**

| Chemikálie                 | Odměřené množství |
|----------------------------|-------------------|
| 1M Tris-HCl (pH = 6,8)     | 0,6 ml            |
| 50 % (w/v) glycerol        | 5,0 ml            |
| 10 % (w/v) SDS             | 2,0 ml            |
| $\beta$ -merkaptoethanol   | 0,5 ml            |
| 1% (w/v) bromfenolová modř | 1,0 ml            |
| dH <sub>2</sub> O          | 0,9 ml            |

**Tabulka 10: Složení 4% polyakrylamidového zaváděcího gelu**

| Chemikálie  | Odměřené množství |
|---|-------------------|
| Rotiphorese Gel 30                                      | 0,25 ml           |
| pufr pro 4% zaváděcí gel (viz <i>Tab. 12</i> , str. 40) | 465 $\mu$ l       |
| dH <sub>2</sub> O                                       | 1,125 ml          |
| 10% persulfát amonný                                    | 25 $\mu$ l        |
| TEMED   | 7,5 $\mu$ l       |

**Tabulka 11: Složení 15 % polyakrylamidového separačního gelu**

| Chemikálie                               | Odměřené množství |
|--|-------------------|
| Rotiphorese Gel 30                       | 1,875 ml          |
| pufr pro 15% separační gel (viz Tab. 12) | 0,95 ml           |
| dH <sub>2</sub> O                        | 0,875 ml          |
| 10% (w/v) persulfát amonný               | 25 µl             |
| TEMED                                    | 10 µl             |

**Tabulka 12: Složení pufrů pro přípravu zaváděcího a separačního gelu pro SDS elektroforézu**

| Pufr pro 4% zaváděcí gel |                   | Pufr pro 15% separační gel |                   |
|--------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|
| Chemikálie               | Odměřené množství | Chemikálie                 | Odměřené množství |
| 1M Tris-HCl (pH = 6,8)   | 50 ml             | 2M Tris-HCl (pH = 8,8)     | 75 ml             |
| 10 % (w/v) SDS           | 4 ml              | 10 % (w/v) SDS             | 4 ml              |
| dH <sub>2</sub> O        | 46 ml             | dH <sub>2</sub> O          | 46 ml             |

**Tabulka 13: Složení 10×koncentrovaného pufru pro SDS elektroforézu**

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

Roztok byl doplněn deionizovanou vodou do 1 l.

**Tabulka 14: Složení barvicího roztoku pro vizualizaci proteinů zachycených na gelu po elektroforéze**

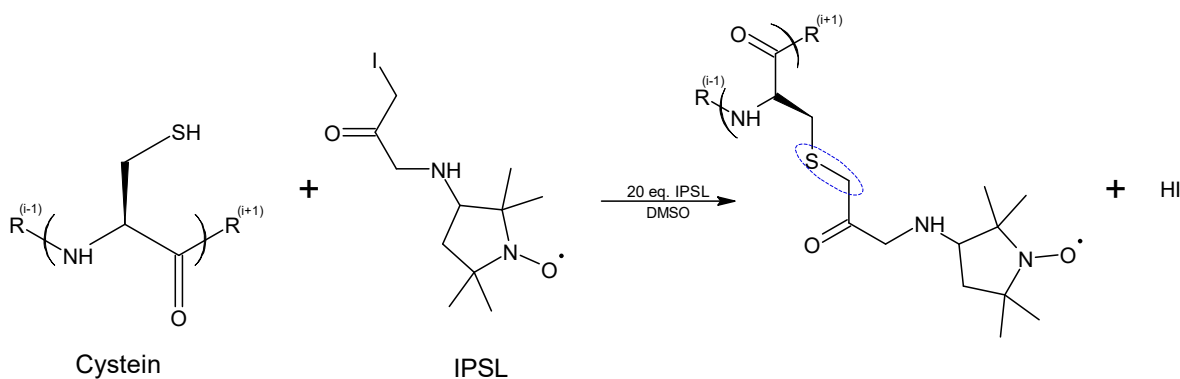
| Chemikálie | Odměřené množství |
|------------|-------------------|
| CBB G-250  | 80 mg             |
| 35 % HCl   | 3 ml              |

Roztok byl doplněn deionizovanou vodou do 1 l.

## 5.9 Značení FOXO4-DBD pro PRE NMR experiment

K přípravě vzorku pro provedení NMR měření paramagnetického zesílení relaxace bylo nutné purifikovaný protein kvantitativně chemicky modifikovat. FOXO4-DBD byl exprimován jako mutantní protein se změnou v jedné aminokyselině – threonin v poloze 134 byl substituován cysteinem. Právě v této poloze bylo žádoucí označit protein organickým radikálem 3-(2-Iodoacetamido)-PROXYL (zkráceně IPSL) a vytvořit tak paramagnetický systém. Magnetický dipólový moment volného elektronu interaguje s magnetickými

dipólovými momenty NMR aktivních jader a urychluje proces jejich relaxace při měření NMR experimentu. Chemická reakce mezi cysteinem a IPSL probíhá za vzniku thioetherové vazby. V sekvenci FOXO4-DBD se jedná o jediný cystein, takže je zajištěno, že nebudou vznikat vedlejší produkty. Thiolová funkční skupina cysteinu se chová jako silný nukleofil a slabá báze, s primárním alkyljodidem bude podléhat substituční reakci probíhající S<sub>N</sub>2 mechanismem<sup>69</sup>, viz reakční schéma na Obr. 5.2.



**Obrázek 5.2 – Reakční schéma chemické modifikace cysteinu radikálem 3-(2-Iodoacetamido)-PROXYL** (vytvořeno v ACD/ChemSketch).

**Příprava reakční směsi:** Alikvóty roztoku proteinu byly rozmrazeny při pokojové teplotě a roztok proteinu byl přenesen do dialyzační membrány. Přes noc byla provedena dialýza proti 1 l pufru A se složením uvedeném v *Tabulce 15*, str. 42. Následující ráno byl protein dialyzován do čerstvého dialyzačního pufru po dobu tří hodin, aby došlo k důkladnému odstranění přítomného DTT po gelové permeační chromatografii. DTT totiž obsahuje dvě thiolové funkční skupiny, které mohou kompetičně reagovat v S<sub>N</sub>2 reakci s IPSL namísto s cysteinem. Po dialýze byl ředěním připraven 3ml roztok proteinu o koncentraci 150 μM. Z roztoku bylo odebráno 100 μl pro pozdější analýzu hmotnostní spektrometrií. Bylo naváženo 9,8 mg IPSL a rozpuštěno v 1 ml DMSO. Z takto připraveného 30 mM roztoku IPSL v DMSO bylo přesunuto 330 μl do zkumavky s 2,9 ml 150 μM roztoku proteinu. Eppendorfova zkumavka byla obalena do alobalu a přesunuta do stinného místa. Reakce probíhala při pokojové teplotě, po 4 hodinách byla zkumavka s reakční směsí přesunuta do lednice a ponechána přes noc při 4 °C.

**Tabulka 15: Složení pufru A, 2x2 l**

| <b>Chemikálie</b>   | <b>Výsledná koncentrace</b> |
|---------------------|-----------------------------|
| Tris-HCl (pH = 7,5) | 50 mM                       |
| NaCl                | 150 mM                      |

Následující ráno byla provedena ultrafiltrace reakční směsi v centrifuze při 1500×g a teplotě 4°C po dobu 4 minut. Ultrafiltrace bylo opakována dokud nebylo dosaženo objemu roztoku proteinu 1,5 ml. Byl použit koncentrátor s membránou propustnou pro molekuly o molekulové hmotnosti nižší než 10 kDa. Za účelem přečištění proteinu byla opakována gelová permeační chromatografie. Byla použita kolona HiLoad Superdex 75 Increase 10/300. Jako mobilní fáze byl použit 50mM Tris pufr o pH 7,5 (složení viz *Tabulka 15*) o průtoku 0,5 ml/min. Frakce byly jímány po 0,75 ml. Průběh chromatografie byl sledován měřením měrné elektrické vodivosti a absorbance při 280 nm v ústí kolony. Frakce jímáné v oblasti absorpčního píku byly vzaty k SDS-PAGE analýze. 100 µl vzorku před značením IPSL a 100 µl vzorku po značení a přečištění gelovou permeační chromatografií bylo posláno k analýze hmotnostní spektrometrií. Hmotnostní analýza byla provedena za účelem ověření kvantitativního značení FOXO4-DBD proteinu 3-(2-Iodoacetamido)-PROXYL radikálem.

## **5.10 Nukleární magnetická rezonance**

Nukleární (jaderná) magnetická rezonance (NMR) je fyzikální jev, který je zapříčiněn slabým oscilujícím magnetickým polem působícím na jádra atomů s nenulovým spinem vložených do silného konstantního magnetického pole. Spektroskopie nukleární magnetické rezonance je metoda využívající tohoto jevu ke studiu složení a struktury molekul zkoumané látky. Nenulový jaderný spin je vždy asociován s nenulovým celkovým magnetickým momentem jádra, který je potřebný pro měření spektrálních přechodů mezi jadernými spinovými hladinami rozštěpenými vlivem vnějšího magnetického pole<sup>70</sup>.

Jádra s nenulovým spinem se pro potřeby NMR spektroskopie označují jako „NMR aktivní“. Mezi nejčastěji měřená NMR aktivní jádra patří <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, méně často pak <sup>31</sup>P a <sup>19</sup>F. Všechny výše uvedená jádra mají spin ½ a v přítomnosti magnetického pole o indukci  $B_0$  jsou energetické hladiny takových jader rozštěpeny na dvě hladiny. Přechod mezi těmito energetickými stavy je dán rezonanční podmínkou, která odpovídá frekvenci přechodu podle vztahu<sup>70</sup>:

$$\nu = \gamma B_0 / 2\pi \quad (5.3)$$

kde  $\nu$  je rezonanční frekvence daného jádra (řádově se pohybuje v MHz) a  $\gamma$  je gyromagnetický poměr, který je pro dané jádro charakteristickou konstantou. Podle výše uvedeného vzorce by všechna jádra jednoho izotopu v témže magnetickém poli rezonovala při stejné frekvenci. Ve skutečnosti je však reálné magnetické pole působící na konkrétní jádro v molekule závislé na blízkém chemickém okolí daného jádra (dochází ke stínění elektrony a tzv. spin-spinové interakci sousedních jader). Pouze jádra stejného izotopu a současně se stejným chemickým okolím mají stejnou rezonanční frekvenci. Taková jádra v NMR spektroskopii označujeme za chemicky ekvivalentní.

Právě detaily elektronové struktury v okolí jednotlivých jader předurčují využití NMR ke zkoumání struktury molekul a vysvětlují bohaté podoby naměřených spekter. NMR spektrum vyjadřujeme jako závislost intenzity na chemickém posunu. Chemický posun,  $\delta$ , je definován vztahem:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_0}{\nu_0} \cdot 10^6 \text{ [ppm]} \quad (5.4)$$

kde  $\nu$  je rezonanční frekvence daného jádra a  $\nu_0$  je rezonanční frekvence referenčního jádra.

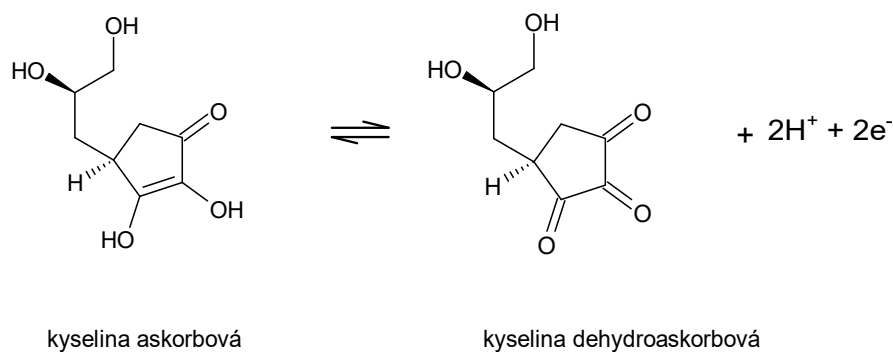
Při řešení proteinové struktury je nutné identifikovat chemické posuny měřených jader hlavního řetězce (kostry proteinu) a rozlišit je od chemických posunů jader postranních řetězců aminokyselin. Ke studiu interakce FOXO4-DBD<sub>(86-211)</sub> a p53-TAD<sub>(1-93)</sub> bylo využito standardního 2D experimentu, který koreluje chemické posuny dvou typů jader (<sup>1</sup>H a <sup>15</sup>N). Vzorek pro NMR měření obsahoval <sup>15</sup>N značený p53-TAD v přítomnosti IPSL značeného FOXO4-DBD. Zároveň bylo při experimentu využito jevu tzv. paramagnetického zesílení relaxace (z angl. Paramagnetic Relaxation Enhancement, zkráceně PRE)<sup>71</sup>.

**2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC experiment:** HSQC experiment (z angl. Heteronuclear Single Quantum Correlation) poskytuje dvou dimenzionální spektrum s jednou osou pro proton (<sup>1</sup>H) a druhou osou pro heterojádro (tzn. jádro jiné než proton, v tomto případě <sup>15</sup>N). Magnetické pole excituje jádro vodíku a z něj se magnetizace přenáší pomocí J-interakce zprostředkované elektrony na dusík a po prodlevě zase zpět na vodík. Na 2D spektru přitom nalezneme pík pro každý jedinečný proton vázaný k heterojádro, zatímco ostatní nekorelované signály jsou

potlačeny. V proteinovém NMR je u každé peptidové vazby, s výjimkou prolinu, připojen amidový vodík, který může produkovat signál ve spektru. Kromě rezonancí pocházející z amidové kostry proteinu však signál dávají také protony vázané na dusík u postranních řetězců aminokyselin N, Q a W.

**Paramagnetické zesílení relaxace:** Nespárovaný elektron u paramagnetických molekul dává vzniknout velkému magnetickému momentu molekuly, který ovlivňuje vlastnosti měřeného roztoku při NMR. Zejména dochází k rapidnímu urychlení relaxace excitovaných jader v okolí paramagnetického centra. Jádra do určité vzdálenosti od paramagnetického centra jsou pak v naměřeném spektru neviditelné (neposkytnou signál) nebo je intenzita daného signálu menší. Metoda PRE NMR dokáže poskytnout strukturní informace do vzdálenosti přibližně 15–24 Å od paramagnetického centra<sup>72</sup>. Vedle metod NMR založených na jaderném Overhauserovém efektu (zkráceně NOE, z angl. Nuclear Overhauser effect), které poskytují strukturní informaci na vzdálenosti 6 Å, tak metoda PRE NMR umožňuje studovat i slabší interakce na větší vzdálenosti. PRE NMR metody se dá využít při studiu slabých vazebných interakcí proteinů, a to i interakcí takových proteinů, které jsou prostorově nestrukturované a vysoce flexibilní, takže jejich vazebné rozhraní tvoří převážně přechodné kontakty<sup>73</sup>.

Jestliže do jednoho z interagujících proteinů je zavedena skrze cysteinový postranní řetězec malá organická molekula s nespárovaným elektronem, a označený protein (paramagnetický systém) je ponechán interagovat za fyziologických podmínek v roztoku s druhým proteinem (kultivovaným v <sup>15</sup>N médiu), pro nějž je naměřeno klasické HSQC spektrum, tak pak lze porovnat jednotlivé píky takto získaného spektra s HSQC spektrem stejného vzorku, u nějž byl nespárovaný elektron redukován (diamagnetický systém). Můžeme tak pozorovat, které signály v případě prvního spektra chybí nebo mají nižší intenzitu. Podle poklesu intenzit jednotlivých píků pak lze usuzovat vzdálenosti jader od paramagnetického centra a získat představu o tom, které aminokyselinové zbytky se podílí na interakci. V této práci bylo paramagnetické centrem lokalizováno na 134C FOXO4-DBD<sub>(86-211)</sub>, tzn. na vazebném partneru <sup>15</sup>N značeného p53<sub>(1-93)</sub>, jehož <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spektrum bylo měřeno. Nespárovaný elektron může být redukován kyselinou askorbovou, která poskytuje elektron IPSL a oxiduje se na kyselinu dehydroaskorbovou, viz *Obrázek 5.3*, str. 45.



Obrázek 5.3 – Redukovaná a oxidovaná forma kyseliny askorbové

### 5.10.1 Příprava vzorků

Pro NMR experimenty byl připraven vzorek obsahující 150  $\mu\text{M}$  IPSL značený FOXO4<sub>(86-211)</sub> (T134C) a 100  $\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$  značený p53<sub>(1-93)</sub>. Vzhledem k náročnosti a ceně přípravy byl purifikovaný  $^{15}\text{N}$  značený p53<sub>(1-93)</sub> protein potřebný pro NMR experimenty dodán Mgr. Klárou Kohoutovou (Katedra fyzikální a makromolekulární chemie Přf UK). K NMR měření byl použit 850 MHz spektrometr Bruker Avance III (Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i.). Byly provedeny dva 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC experimenty. NMR měření probíhaly při 293 K. Získaná spektra byla vyhodnocena v programu Sparky 3.115<sup>74</sup>.

**Příprava 1. vzorku:** Do 5mm NMR kvyety byl připraven roztok 150  $\mu\text{M}$  IPSL značeného FOXO4<sub>(86-211)</sub> (T134C) s 100  $\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$  značeným p53<sub>(1-93)</sub>. Složení 1. vzorku je uvedeno v *Tabulce 16*, str. 46. Složení pufru použitého k přípravě obou vzorků pro NMR měření je uvedeno v *Tabulce 17*, str. 46.

**Příprava 2. vzorku:** K přípravě vzorku pro 2. NMR měření bylo nutné kvantitativně redukovat nespárovaný elektron na připraveném paramagnetickém systému 3-(2-Iodoacetamido)-PROXYL FOXO4-DBD. Jako redukční činidlo byla použita kyselina askorbová. Do kvyety s 1. vzorkem byl přidán 1  $\mu\text{l}$  1M askorbové kyseliny (pH = 7,4) a po 30 minutové inkubaci bylo naměřeno 2. HSQC spektrum. Složení 2. vzorku je uvedeno v *Tabulce 18*, str. 46.

**Tabulka 16: Složení 1. vzorku pro NMR měření**

| <b>Roztok</b>   | <b>Odměřené množství</b> |
|---|--------------------------|
| 236 $\mu\text{M}$ $^{15}\text{N}$ p53 <sub>(1-93)</sub> | 233 $\mu\text{l}$        |
| 402 $\mu\text{M}$ IPSL-FOXO4 <sub>(86-211)</sub>        | 205 $\mu\text{l}$        |
| pufř pro NMR experiment (viz <i>Tab. 17</i> )           | 57 $\mu\text{l}$         |
| D <sub>2</sub> O  | 55 $\mu\text{l}$         |

**Tabulka 17: Pufř pro NMR experiment**

| <b>Chemikálie</b>       | <b>Výsledná koncentrace</b> |
|-------------------------|-----------------------------|
| 1 M Tris-HCl (pH = 7,4) | 25 mM                       |
| NaCl                    | 150 mM                      |

**Tabulka 18: Složení 2. vzorku pro NMR měření**

| <b>Roztok</b>                               | <b>Odměřené množství</b> |
|---|--------------------------|
| 1. vzorek (viz <i>Tab. 16</i> )             | 550 $\mu\text{l}$        |
| 1 M kyselina askorbová (pH upraveno na 7,4) | 1 $\mu\text{l}$          |

## 6 Výsledky

### 6.1 Exprese FOXO4-DBD

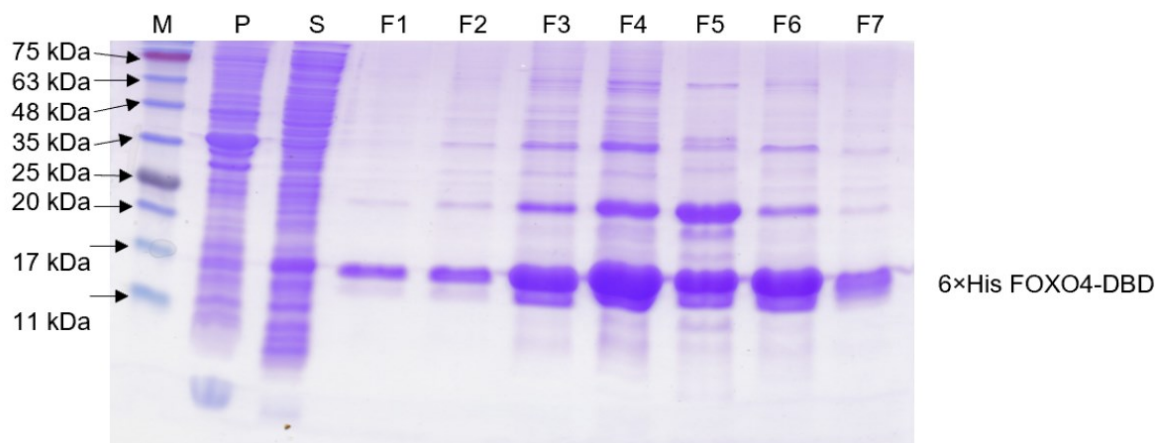
Exprese FOXO4-DBD byla provedena v bakteriích *E. Coli*, kmen BL21(DE3). Buňky byly pěstovány v 2 litrech LB média po dobu 17 hodin při 20 °C. FOXO4-DBD byl exprimován jako fúzní protein s 6 histidinovými zbytky na N-konci následovanými trombinovým štěpným místem (6×His FOXO4-DBD). Buněčné kultury byly sedimentovány na centrifuze při 4 °C a 2073×g. Sedimenty buněčné kultury byly resuspendovány v dohromady 60 ml lyzačního pufru. Následovala lýze buněk působením lysozymu a cyklů ultrazvukových pulsů o výkonu 55 wattů po dobu 15 minut.

### 6.2 Purifikace FOXO4-DBD

V následujících oddílech budou prezentovány výsledky hlavních purifikačních kroků provedených za účelem izolace FOXO4-DBD z proteomu získaného po lýzi buněk. Purifikace byla zahájena niklovou chelatační chromatografií, následovaná štěpením histidinové kotvy a dialýzou. Dalším krokem byla kationtově výměnná chromatografie a proces purifikace byl zakončen gelovou permeační chromatografií.

#### 6.2.1 Niklová chelatační chromatografie

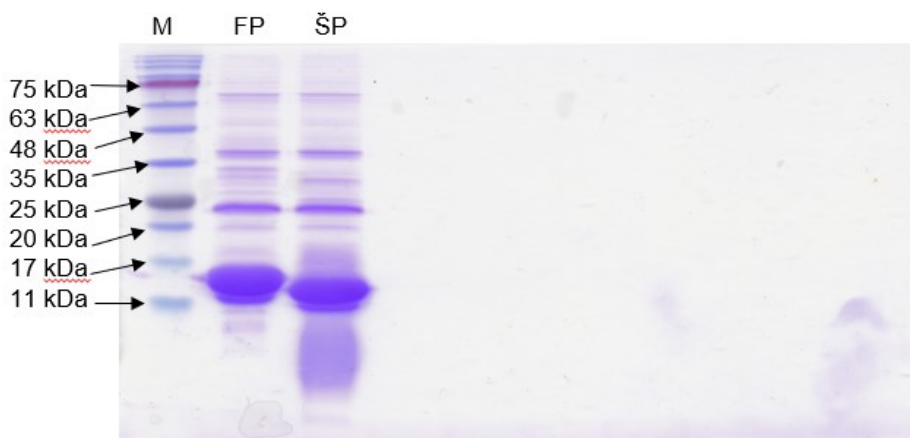
Niklová chelatační chromatografie byla provedena na koloně s 5 ml Chelating Sepharose. Eluce proteinu byla zajištěna nadbytkem imidazolu. Bylo jímáno 7 frakcí po 1,5 ml. Frakce byly analyzovány metodou SDS-PAGE na 15% polyakrylamidovém gelu. Obarvený gel po elektroforéze je ukázán na *Obrázku 6.1*, str. 48. Výsledek SDS-PAGE vypovídá o značné specifitě niklové chelatační chromatografie, neboť byl získán 6×His FOXO4-DBD o relativně vysoké čistotě. Pro pozdější značení radikálem 3-(2-Iodoacetamido)-PROXYL a provedení NMR experimentu je žádoucí čistota vyšší. Nečistoty, které jsou přítomny v důsledku nespecifických interakcí (např. elektrostatické interakce) proteinů obsažených v lyzátu se stacionární fází, je proto třeba odstranit dalšími purifikačními kroky.



**Obrázek 6.1** – Gel získaný metodou SDS-PAGE na 15% polyakrylamidovém gelu s frakcemi jímanými po Niklové chelatační chromatografii. První dráha gelu (M) náleží standardu molekulových hmotností ROTI®Mark TRICOLOR (Carl Roth). Dráhy F1-F7 přísluší jímaným frakcím. Do dráhy označené písmenem P byl pipetován vzorek zředěné buněčné frakce a do dráhy S vzorek supernatantu buněčného lyzátu.

### 6.2.2 Dialýza a štěpení trombinem

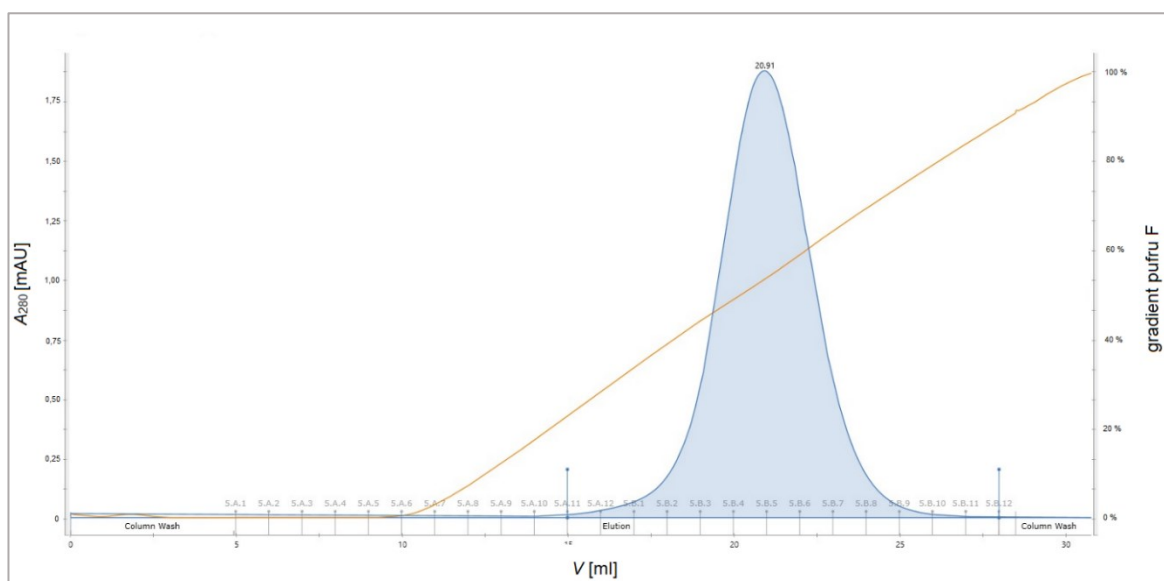
Frakce F1-F7 byly sloučeny a byla provedena dialýza. Byla použita dialyzační membrána nepropustná pro molekuly větší než 6-8 kDa. Měřením absorbance při 280 nm byl stanoven výtěžek fúzního proteinu v roztoku proteinu 6×His-FOXO4-DBD na 25 mg. Na štěpení fúzního proteinu bylo použito 250 U trombinu. Metodou SDS-PAGE bylo ověřeno kvantitativní odštěpení histidinové kotvy (*Obrázek 6.2*). Z obarveného gelu je vidět, že pás FOXO4-DBD po štěpení je posunutý k nižším molekulovým hmotnostem, což odpovídá ztrátě histidinové kotvy (hmotnostní rozdíl fúzního proteinu a štěpeného proteinu činí přibližně 0,8 kDa).



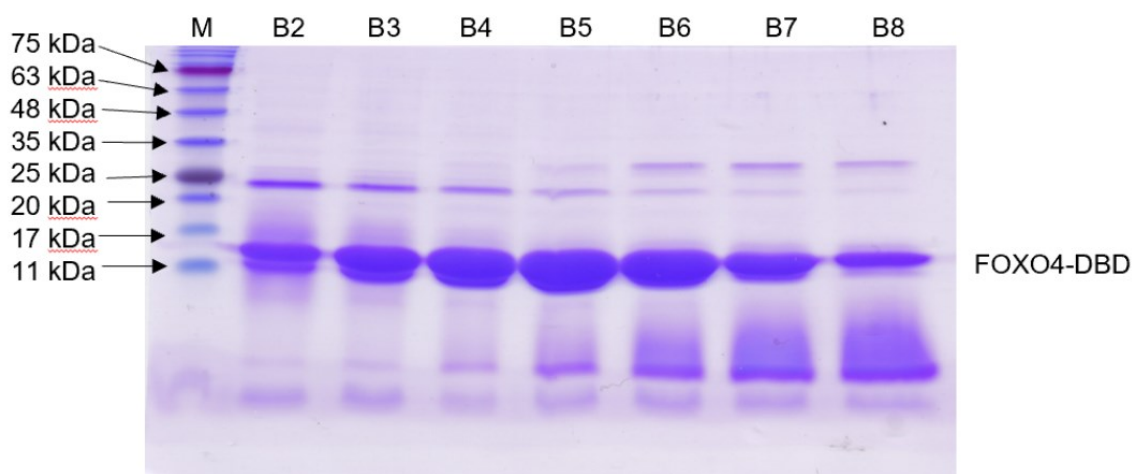
**Obrázek 6.2** – Gel získaný metodou SDS-PAGE na 15 % polyakrylamidovém gelu dokazující kvantitativní odštěpení Histidinové afinitní kotvy. První dráha gelu (M) náleží standardu molekulových hmotností ROTI®Mark TRICOLOR (Carl Roth). Do dráhy označené FP (fúzní protein) byl pipetován vzorek vzatý z dialýzy před štěpením a do dráhy označené ŠP (štěpený protein) vzorek z dialyzační membrány po proběhlé dialýze a po štěpení trombinem.

### 6.2.3 Kationtově výměnná chromatografie

Kationtově výměnná chromatografie byla provedena za účelem zbavit se většiny nežádoucích proteinů, např. trombinu. Eluce byla provedena gradientem soli. Frakce byly jímány do mikrotitrační destičky po 1 ml. Získaný chromatogram je znázorněn na *Obr. 6.3*. Metodou SDS-PAGE byla ověřena přítomnost a čistota FOXO4-DBD frakcí B2-B8 (viz *Obr. 6.4*). K dalšímu purifikačnímu kroku byly vzaty všechny analyzované frakce (B2-B8), které byly po sjednocení ultrafiltrací koncentrovány na objem 1,5 ml.



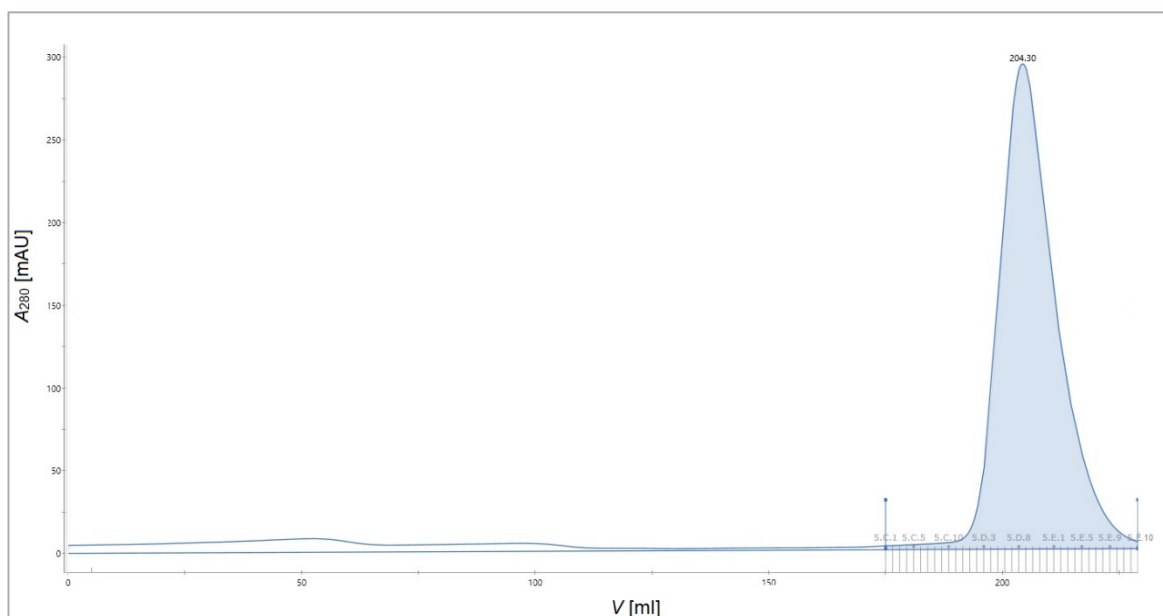
**Obrázek 6.3 – Chromatogram při kationtově výměnné chromatografii:** Závislost absorbance při 280 nm, měřené v ústí kolony, na elučním objemu (modrá křivka) a gradient elučního pufru v průběhu chromatografie (oranžová přímka). Jednotlivé frakce byly jímány po 1 ml a jsou vyznačeny na ose elučního objemu. Z frakcí B2-B8 bylo odebráno vždy 10  $\mu$ l k SDS-PAGE analýze.



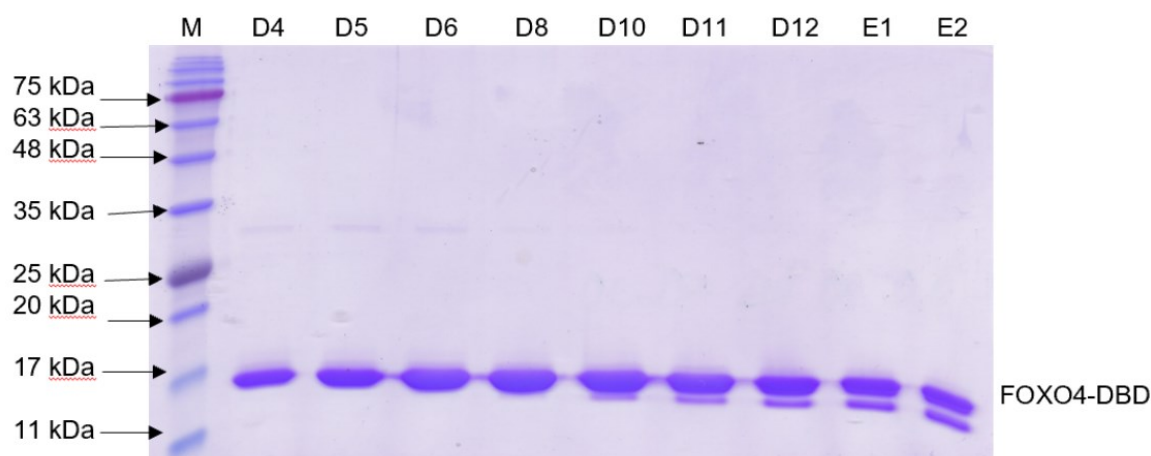
**Obrázek 6.4 – Gel získaný metodou SDS-PAGE na 15 % polyakrylamidovém gelu s frakcemi jímánymi po kationtově výměnné chromatografii.** První dráha gelu (M) náleží standardu molekulových hmotností ROTI<sup>®</sup>Mark TRICOLOR (Carl Roth). Dráhy B2-B8 přísluší jímáným frakcím.

## 6.2.4 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie byla provedena na koloně HiLoad<sup>TM</sup> 26/600 Superdex<sup>TM</sup> 75  $\mu$ g s rychlostí průtoku mobilní fáze 2 ml/min. Frakce byly jímány do mikrotitrační destičky po 1,5 ml. Záznam eluce je znázorněn chromatogramem na *Obr. 6.5*. Výsledek separačního procesu byl ověřen metodou SDS-PAGE (viz *Obr. 6.6*, str. 51). Obrázek gelu vypovídá o dosažení požadované čistoty proteinu. Počínaje frakcí D10 se objevuje i druhý pás, který pravděpodobně představuje degradované FOXO4-DBD s několika chybějící aminokyselinami na C-konci. Sloučeny proto byly pouze frakce D4-D12. Frakce D4-D12 byly sjednoceny, byla změřena absorbance roztoku proteinu při 280 nm a vypočten výtěžek purifikace. Purifikačním sledem kroků bylo získáno 5,6 mg FOXO4-DBD. Protein byl skladován při  $-80$  °C.



**Obrázek 6.5 – Chromatogram při gelové permeační chromatografii:** Závislost absorbance při 280 nm, měřené v ústí kolony, na elučním objemu (modrá křivka). K analýze SDS-PAGE metodou byly vzaty vzorky z frakcí D4-D6, D8, D10-D12 a E1-E2 (vzhledem k symetričnosti píku nebyly analyzovány frakce D7 a D9). Jako poslední analyzovaná frakce byla vybrána frakce E2. U později jímáných frakcí se předpokládalo odpadnutí několika aminokyselin na C-konci řetězce.

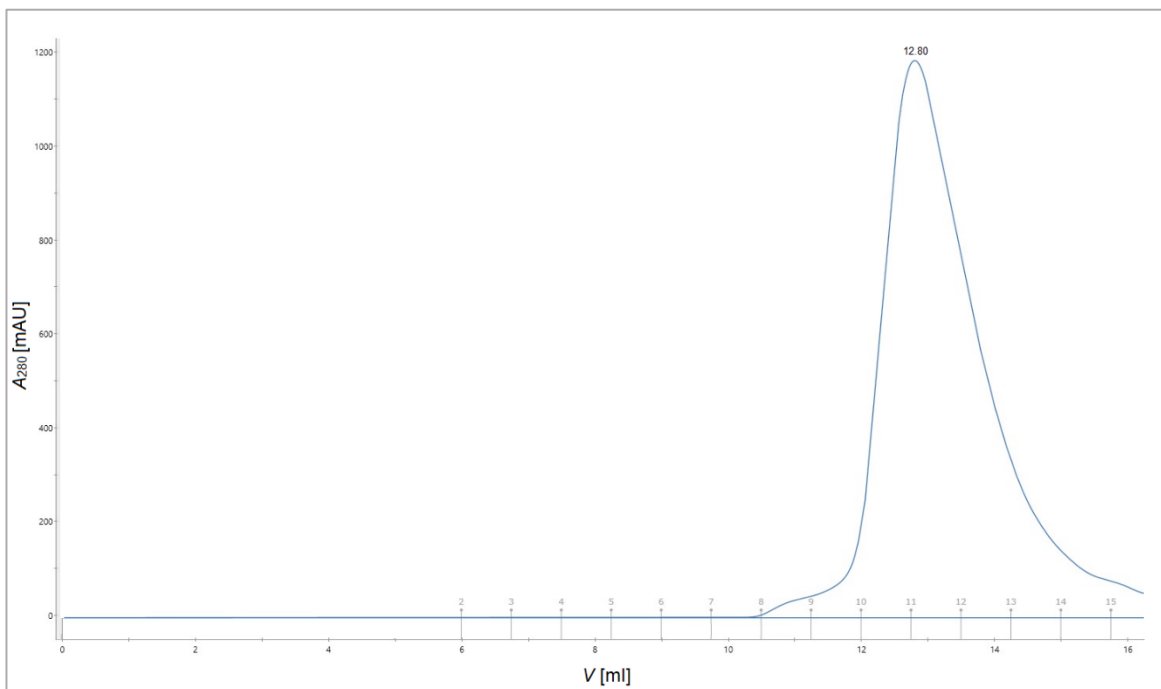


**Obrázek 6.6 – Gel získaný metodou SDS-PAGE na 15 % polyakrylamidovém gelu s frakcemi jímánymi po gelové permeační chromatografii.** První dráha gelu (M) náleží standardu molekulových hmotností ROTI®Mark TRICOLOR (Carl Roth). Dráhy D4-E2 přísluší jímáným frakcím.

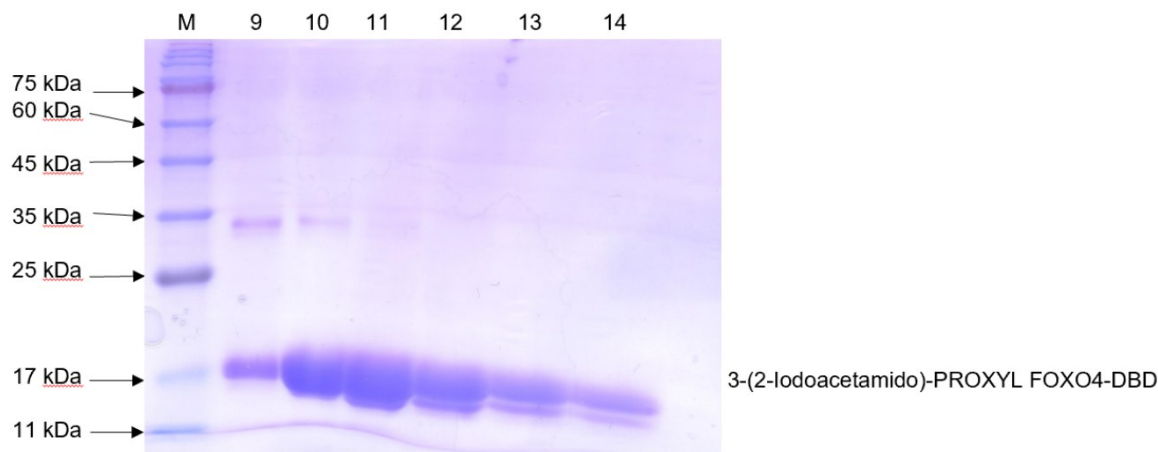
### 6.3 Značení FOXO4-DBD radikálem 3-(2-Iodoacetamido)-PROXYL

Byla připravena reakční směs s 150  $\mu\text{M}$  FOXO4<sub>(86-211)</sub> (T134C) a 3 mM radikálem 3-(2-Iodoacetamido)-PROXYL (použito 20 molárních ekvivalentů). Reakce probíhala bez přístupu světla při 4 °C po dobu 15 hodin, ale indukce reakce byla provedena při pokojové teplotě po dobu 4 hodin. Následovala filtrace reakční směsi a koncentrování roztoku proteinu na 1,5 ml. Na koloně HiLoad Superdex 75 Increase 10/300 byla provedena gelová permeační chromatografie za průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min. Frakce byly jímány po 0,75 ml. Průběh chromatografie je zaznamenán na *Obr. 6.7*, str. 52. Ze získaného gelu metodou SDS-PAGE (viz *Obr. 6.8*, str. 52) je u eluovaných frakcí 9 a 10 vidět blízko 35 kDa pruh nečistot. Protože by bylo nežádoucí provádět NMR měření s velkým znečištěním, tak byly pro další použití sjednoceny pouze frakce 10-13. Výsledek analýzy hmotnostní spektrometrií je znázorněn dvěma hmotnostními spektry na *Obr. 6.9*, str. 53. Hmotnostní analýza byla provedena RNDr. Petrem Pompachem Ph.D. metodou MALDI-TOF (z angl. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*). U hmotnostního spektra neznačeného proteinu (na *Obr. 6.9* nahoře) přísluší píku intaktního (celého) FOXO4-DBD pseudomolekulového iontu váha přibližně 14 821 Da. Píky u nižších hodnot  $m/z$  přísluší degradačním produktům FOXO4-DBD proteinu. Neznačený pík s nejvyšší hodnotou  $m/z$  je pravděpodobně nečistota, viditelná taktéž na elektroforetickém gelu blízko 35 kDa. U spektra značeného proteinu (na *Obr. 6.9* dole) jsou píky analogických fragmentů posunuty k vyšším hodnotám  $m/z$  (poměr hmotnosti

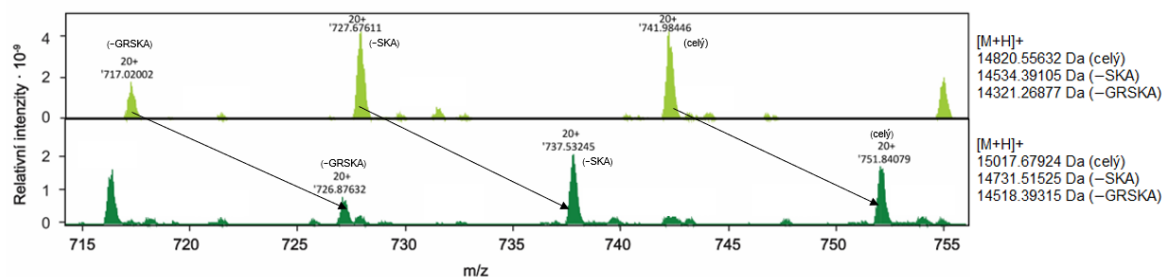
a náboje fragmentu). Výsledek potvrzuje 100% chemickou modifikaci FOXO4-DBD radikálem 3-(2-Iodoacetamido)-PROXYL.



**Obrázek 6.7 – Chromatogram při gelové permeační chromatografii po labelování proteinu radikálem 3-(2-Iodoacetamido)-PROXYL:** Závislost absorbance při 280 nm, měřené v ústí kolony, na elučním objemu (modrá křivka). K analýze SDS-PAGE metodou byly vzaty vzorky z jímaných frakcí 9-14.



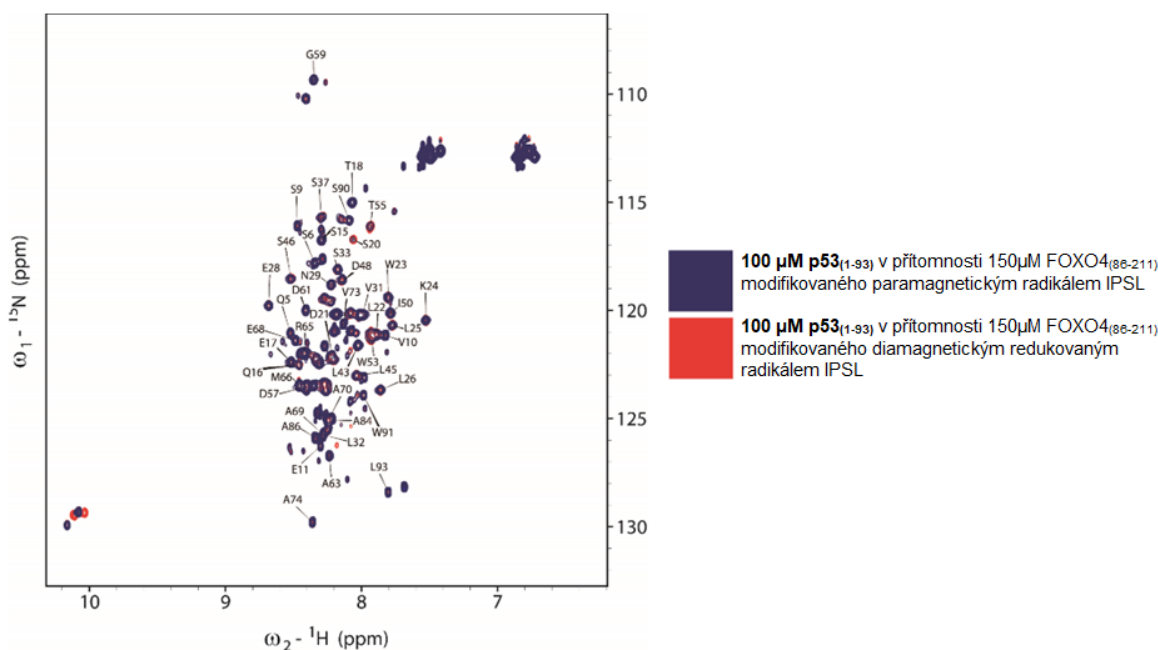
**Obrázek 6.8 – Gel získaný metodou SDS-PAGE na 15 % polyakrylamidovém gelu s frakcemi jímanými po 2. gelové permeační chromatografii.** První dráha gelu (M) náleží standardu molekulových hmotností ROTI®Mark TRICOLOR XTRA (Carl Roth). Dráhy 9-14 přísluší jímaným frakcím.



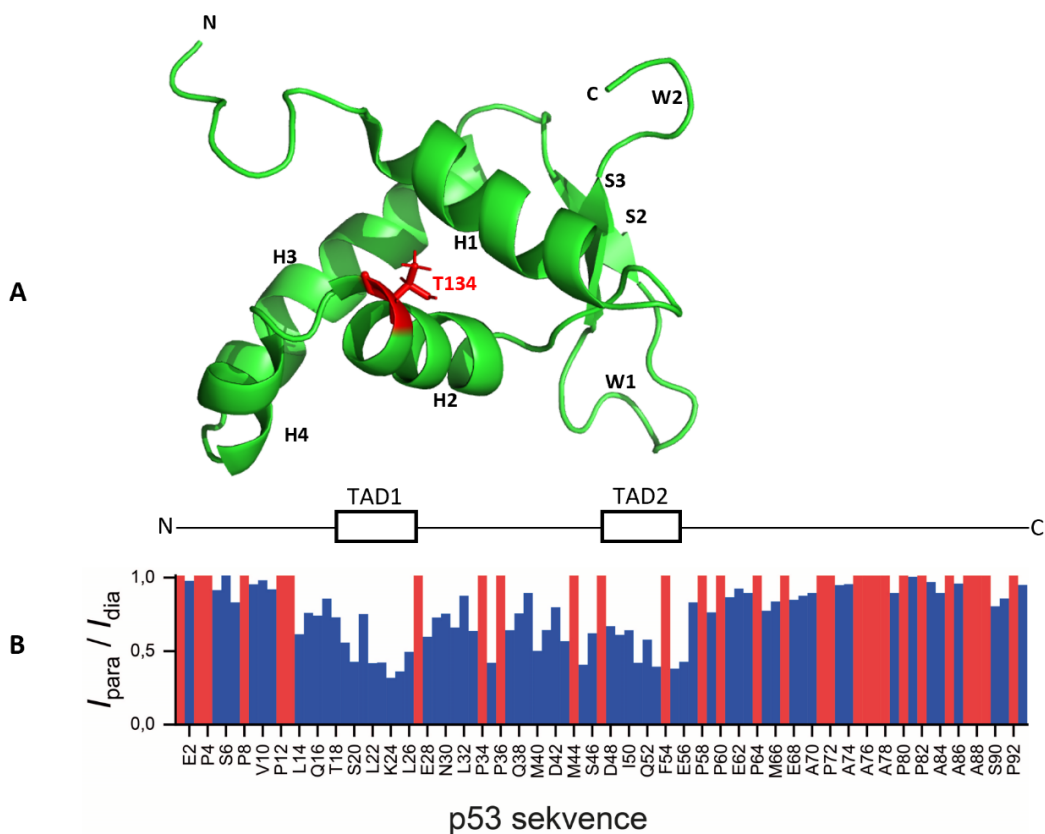
**Obrázek 6.9 – Hmotnostní spektrum získané metodou MALDI-TOF:** hmotnostní spektrum vzorku FOXO4-DBD před chemickou modifikací IPSL (nahore) a hmotnostní spektrum vzorku FOXO4-DBD po značení IPSL (dole). Šipky znázorňují posun k vyšším hodnotám  $m/z$  sobě odpovídajících píků neznačeného a značeného proteinu.

#### 6.4 Studium interakce p53-TAD a FOXO4-DBD pomocí NMR

Bylo připraveno 550  $\mu\text{l}$  vzorku se 150  $\mu\text{M}$  IPSL značeným FOXO4<sub>(86-211)</sub> (T134C) a 100  $\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$  značeným p53<sub>(1-93)</sub> v 10 % (v/v) D<sub>2</sub>O a v pufru obsahujícím 25 mM Tris-HCl (pH = 7,4) a 150 mM NaCl. S takto připraveným vzorkem bylo naměřeno  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrum při 293 K. Získané spektrum bylo ovlivněno jevem paramagnetického zesílení relaxace, neboť FOXO4<sub>(86-211)</sub> byl značený IPSL volným radikálem. Ke stejnému vzorku byl přidán 1  $\mu\text{l}$  1 M askorbové kyseliny za účelem redukce volného radikálu a  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrum bylo naměřeno znovu. Superimpozice naměřených spekter je znázorněna na *Obr. 6.10*, str. 54. Ze superimpozice spekter je patrný pokles intenzity například u aminokyselin S20 a T55. Vyhodnocení změn v relaxaci NMR aktivních jader značeného proteinu bylo provedeno porovnáním intenzit píků získaných při prvním a druhém měření. Změny v intenzitách píků přiřazených aminokyselin p53<sub>(1-93)</sub> proteinu vyjadřuje *Obr. 6.11*, str. 54.



**Obrázek 6.10 – Superimpozice  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektra I. a II. NMR měření.** Spektrum koreluje chemický posun  $^1\text{H}$  (osa x) a  $^{15}\text{N}$  (osa y) vázaných atomů proteinu p53<sub>(1-93)</sub>.



**Obrázek 6.11 – A** Stuhový model struktury FOXO4<sub>(92-181)</sub> v roztoku. Červeně je zvýrazněn threonin v poloze 134, který byl nahrazen cysteinem a chemicky modifikován IPSL. Prvky sekundární struktury jsou označeny H1-H4 ( $\alpha$ -helixy), S2-S3 ( $\beta$ -listy) a W1-W2 („křídla“ typické pro FOX proteiny). **B** Poměry intenzit pík přiřazených aminokyselin  $^{15}\text{N}$  značeného p53<sub>(1-93)</sub> naměřených při prvním měření (s paramagnetickým FOXO4<sub>(86-211)</sub>) a druhém měření (s diamagnetickým FOXO4<sub>(86-211)</sub>). Aminokyseliny, kterým v HSQC spektru chybí přiřazení jsou reprezentovány červeným sloupečkem.

## 7 Diskuze

Cílem této práce bylo charakterizovat vazebné rozhraní komplexu transkripčních faktorů FOXO4 a p53. Proteiny p53 i FOXO4 o plné délce jsou v roztoku nestabilní a jejich komplex nelze vykrystalizovat. FOXO4 je totiž kromě DNA-vazebné domény tvořený nestrukturovanými oblastmi. Rovněž p53 má nestrukturované segmenty – a to i N-koncovou transaktivační doménu (TAD), která je přitom podle literatury nezbytná pro interakci s FOXO4. Protein-proteinová interakce p53 s FOXO4 je dána zejména slabými nekovalentními vazbami vysoce flexibilní TAD domény p53 s FOXO4-DBD.

Ke studiu nekovalentní interakce proteinů v roztoku, za podmínek blízkých přirozenému fyziologickému prostředí, byla využita spektroskopie nukleární magnetické rezonance. PRE NMR metoda, založená na jevu paramagnetického zesílení rezonance umožňuje studovat právě slabé přechodné interakce mezi proteiny na poměrně velké vzdálenosti (< 24 Å).

Studium vazebného rozhraní mezi výše uvedenými transkripčními faktory byla v této práci omezena na jeden zkrácený konstrukt obou proteinů. V případě FOXO4 byl použit konstrukt o sekvenci aminokyselin 86-211, odpovídající DNA-vazebné doméně FOXO4 proteinu. V případě p53 byl použit konstrukt o sekvenci aminokyselin 1-93, který odpovídá N-koncové transaktivační doméně a zahrnuje také doménu bohatou na prolin.

Příprava  $^{15}\text{N}$  značeného p53<sub>(1-93)</sub> nebyla vzhledem k náročnosti a ceně přípravy součástí této práce. FOXO4<sub>(86-211)</sub> byl exprimován v buňkách *E. coli* a následně purifikován. Sledem purifikačních kroků – niklové chelatační chromatografie, dialýzy a odštěpení histidinové kotvy, kationtově-výměnné chromatografie a gelové permeační chromatografie bylo připraveno přibližně 5,6 mg proteinu. Výtěžek byl pro provedení experimentu dostatečný. Po provedení gelové permeační chromatografie byl na kontrolním gelu získaném metodou SDS-PAGE u několika frakcí viditelný pruh nečistot o trochu nižší molekulové hmotnosti než FOXO4-DBD. Velmi pravděpodobně se jedná o FOXO4-DBD degradační produkty, kterým chybí několik aminokyselin na C-konci. I když frakce s velkým podílem degradovaného FOXO4-DBD nebyly pro značení IPSL a provedení NMR měření použity, tak se jich úplně zbavit nepodařilo. Neočekávalo se, že by degradační produkty měly interferovat s měřením, takže získaná čistota byla dostatečná.

Výsledek chemické modifikace značení FOXO4 3-(2-iodoacetamido)-PROXYL radikálem byl monitorován porovnáním hmotnostních spekter vzorků před a po značení IPSL metodou MALDI-TOF. Výsledek potvrdil 100% značení IPSL a ukázal výskyt nové

nečistoty, viditelné i na gelu získaném metodou SDS-PAGE s frakcemi eluovanými po 2. gelové permeační chromatografii, provedené za účelem přečištění po chemické modifikaci IPSL. Čistota pro provedení NMR měření byla postačující.

Bylo naměřeno  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrum vzorku  $^{15}\text{N}$  značeného p53<sub>(1-93)</sub>-TAD v přítomnosti FOXO4<sub>(86-211)</sub>-DBD proteinu modifikovaného paramagnetickým radikálem IPSL (měření I.), a v přítomnosti FOXO4<sub>(86-211)</sub>-DBD proteinu modifikovaného diamagnetickým redukováným radikálem IPSL (měření II.). Paramagnetické centrum bylo lokalizováno na 134C, který se nachází na C-koncové oblasti  $\alpha$ -helixu H2 FOXO4-DBD. Superimpozicí získaných spekter byl pozorován pokles intenzit p53 reziduí zejména v oblasti TAD1 (residua 20–26) a TAD2 (residua 50–58). Výsledky této práce proto ukazují, že C-koncová oblast  $\alpha$ -helixu H2 proteinu forkhead domény FOXO4<sub>(86-211)</sub> interaguje hlavně s residuí 20–26 a 50–58 transaktivační domény p53. Bližší charakterizování vazebného rozhraní komplexu p53 a FOXO4 transkripčních faktorů může sloužit jako vodítko k vyvinutí takové nízkomolekulární látky, která by dokázala cíleně rozrušit jejich interakci. Vzhledem k biologické důležitosti interakce mezi těmito transkripčními faktory v regulaci buněčné senescence by taková látka mohla představovat důležitý nález pro terapii onemocnění podmíněných starým věkem.

## 8 Závěr

- Byla připravena DNA-vazebná doména lidského transkripčního faktoru FOXO4 (FOXO4-DBD<sub>(86-211)</sub>) ve výtěžku 5,6 mg a dostatečné čistotě.
- FOXO4-DBD<sub>(86-211)</sub> byl kvantitativně chemicky modifikován radikálem 3-(2-Iodoacetamido)-PROXYL v poloze C134.
- Bylo naměřeno <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spektrum <sup>15</sup>N značeného p53-TAD<sub>(1-93)</sub> v přítomnosti FOXO4-DBD<sub>(86-211)</sub> modifikovaného:
  - a) Paramagnetickým radikálem 3-(2-Iodoacetamido)-PROXYL (měření I.)
  - b) Diamagnetickým redukováným radikálem 3-(2-Iodoacetamido)-PROXYL (měření II.)
- NMR metodou paramagnetického zesílení relaxace bylo zjištěno, že u komplexu FOXO4-DBD<sub>(86-211)</sub> s p53-TAD<sub>(1-93)</sub> interaguje C-koncová oblast helixu H2 forkhead domény FOXO4 s residui 20–26 a 50–58 N-koncové transaktivační domény p53.

## 9 Seznam citované literatury

- (1) 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.
- (2) Alberts, B. *Essential cell biology*; 2004. [Online], [cit. 28.06.2022], dostupné z: <https://archive.org/details/essentialcellbio00albe>
- (3) Eaton, J. D.; West, S. Termination of Transcription by RNA Polymerase II: BOOM! *Trends Genet. TIG* **2020**, *36* (9), 664–675.
- (4) Kodíček, M.; Valentová, O.; Hynek, R. *Biochemie: Chemický Pohled Na Biologický Svět*; VŠCHT: Praha, 2015.
- (5) Williamson, I.; Hill, R. E.; Bickmore, W. A. Enhancers: From Developmental Genetics to the Genetics of Common Human Disease. *Dev. Cell* **2011**, *21* (1), 17–19.
- (6) 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.
- (7) Kaestner, K. H.; Knöchel, W.; Martínez, D. E. Unified Nomenclature for the Winged Helix/Forkhead Transcription Factors. *Genes Dev.* **2000**, *14* (2), 142–146.
- (8) 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.
- (9) 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.
- (10) Obsil, T.; Obsilova, V. Structural Basis for DNA Recognition by FOXO Proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2011**, *1813* (11), 1946–1953.
- (11) Obsil, T.; Obsilova, V. Structure/Function Relationships Underlying Regulation of FOXO Transcription Factors. *Oncogene* **2008**, *27* (16), 2263–2275.
- (12) Kaufmann, E.; Knöchel, W. Five Years on the Wings of Fork Head. *Mech. Dev.* **1996**, *57* (1), 3–20.
- (13) Shimeld, S. M.; Degnan, B.; Luke, G. N. Evolutionary Genomics of the Fox Genes: Origin of Gene Families and the Ancestry of Gene Clusters. *Genomics* **2010**, *95* (5), 256–260.
- (14) 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.
- (15) 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.
- (16) 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.
- (17) Wang, F.; Marshall, C. B.; Ikura, M. Forkhead Followed by Disordered Tail: The Intrinsically Disordered Regions of FOXO3a. *Intrinsically Disord. Proteins* **2015**, *3* (1), e1056906.
- (18) Psenakova, K.; Kohoutova, K.; Obsilova, V.; Ausserlechner, M.; Veverka, V.; Obsil, T. Forkhead Domains of FOXO Transcription Factors Differ in Both Overall Conformation and Dynamics. *Cells* **2019**, *8* (9), 966.
- (19) van der Horst, A.; Burgering, B. M. T. Stressing the Role of FoxO Proteins in Lifespan and Disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8* (6), 440–450.

- (20) 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* (2), 629–634.
- (21) Brownawell, A. M.; Kops, G. J. P. L.; Macara, I. G.; Burgering, B. M. T. Inhibition of Nuclear Import by Protein Kinase B (Akt) Regulates the Subcellular Distribution and Activity of the Forkhead Transcription Factor AFX. *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21* (10), 3534–3546.
- (22) Obsilova, V.; Vecer, J.; Herman, P.; Pabianova, A.; Sulc, M.; Teisinger, J.; Boura, E.; Obsil, T. 14-3-3 Protein Interacts with Nuclear Localization Sequence of Forkhead Transcription Factor FoxO4. *Biochemistry* **2005**, *44* (34), 11608–11617.
- (23) van der Vos, K. E.; Coffey, P. J. FOXO-Binding Partners: It Takes Two to Tango. *Oncogene* **2008**, *27* (16), 2289–2299.
- (24) Calnan, D. R.; Brunet, A. The FoxO Code. *Oncogene* **2008**, *27* (16), 2276–2288.
- (25) Liu, W.; Li, Y.; Luo, B. Current Perspective on the Regulation of FOXO4 and Its Role in Disease Progression. *Cell. Mol. Life Sci.* **2020**, *77* (4), 651–663.
- (26) Tang, T. T.-L.; Lasky, L. A. The Forkhead Transcription Factor FOXO4 Induces the Down-Regulation of Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  by a von Hippel-Lindau Protein-Independent Mechanism. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (32), 30125–30135.
- (27) Furuyama, T.; Kitayama, K.; Shimoda, Y.; Ogawa, M.; Sone, K.; Yoshida-Araki, K.; Hisatsune, H.; Nishikawa, S.; Nakayama, K.; Nakayama, K.; Ikeda, K.; Motoyama, N.; Mori, N. Abnormal Angiogenesis in Foxo1 (Fkhr)-Deficient Mice. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (33), 34741–34749.
- (28) Jiang, S.; Yang, Z.; Di, S.; Hu, W.; Ma, Z.; Chen, F.; Yang, Y. Novel Role of Forkhead Box O 4 Transcription Factor in Cancer: Bringing out the Good or the Bad. *Semin. Cancer Biol.* **2018**, *50*, 1–12.
- (29) Ryu, K. J.; Park, C.; Hong, M.; Ko, Y. H.; Kim, W. S.; Kim, S. J. FOXO4 Expression Is Related to Stem Cell-like Properties and Resistance to Treatment in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Oncotarget* **2016**, *8* (2), 2466–2476.
- (30) Lee, S. H.; Jung, S.; Lee, Y. J.; Hyun, M.; Chung, K. C. FBXO7 Triggers Caspase 8-Mediated Proteolysis of the Transcription Factor FOXO4 and Exacerbates Neuronal Cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **2021**, *297* (6), 101426.
- (31) Soussi, T. The History of P53. *EMBO Rep.* **2010**, *11* (11), 822–826.
- (32) Levine, A. J.; Oren, M. The First 30 Years of P53: Growing Ever More Complex. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9* (10), 749–758.
- (33) Vogelstein, B.; Lane, D.; Levine, A. J. Surfing the P53 Network. *Nature* **2000**, *408* (6810), 307–310.
- (34) 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.
- (35) Halevy, O.; Rodel, J.; Peled, A.; Oren, M. Frequent P53 Mutations in Chemically Induced Murine Fibrosarcoma. *Oncogene* **1991**, *6* (9), 1593–1600.
- (36) Hinds, P.; Finlay, C.; Levine, A. J. Mutation Is Required to Activate the P53 Gene for Cooperation with the Ras Oncogene and Transformation. *J. Virol.* **1989**, *63* (2), 739–746.
- (37) Baker, S. J.; Fearon, E. R.; Nigro, J. M.; Hamilton, S. R.; Preisinger, A. C.; Jessup, J. M.; vanTuinen, P.; Ledbetter, D. H.; Barker, D. F.; Nakamura, Y.; White, R.; Vogelstein, B. Chromosome 17 Deletions and P53 Gene Mutations in Colorectal Carcinomas. *Science* **1989**, *244* (4901), 217–221.
- (38) Delbridge, A. R. D.; Valente, L. J.; Strasser, A. The Role of the Apoptotic Machinery in Tumor Suppression. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4* (11), a008789.

- (39) El-Deiry, W. S. Regulation of p53 downstream Genes. *Semin. Cancer Biol.* **1998**, *8* (5), 345–357.
- (40) Giaccia, A. J.; Kastan, M. B. The Complexity of P53 Modulation: Emerging Patterns from Divergent Signals. *Genes Dev.* **1998**, *12* (19), 2973–2983.
- (41) Meek, D. W. Mechanisms of Switching on P53: A Role for Covalent Modification? *Oncogene* **1999**, *18* (53), 7666–7675.
- (42) Bourgeois, B.; Madl, T. Regulation of Cellular Senescence via the FOXO4-P53 Axis. *FEBS Lett.* **2018**, *592* (12), 2083–2097.
- (43) McLure, K. G.; Lee, P. W. How P53 Binds DNA as a Tetramer. *EMBO J.* **1998**, *17* (12), 3342–3350.
- (44) 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* (2–3), 250–263.
- (45) Grossman, S. R. P300/CBP/P53 Interaction and Regulation of the P53 Response. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268* (10), 2773–2778.
- (46) Olivier, M.; Eeles, R.; Hollstein, M.; Khan, M. A.; Harris, C. C.; Hainaut, P. The IARC TP53 Database: New Online Mutation Analysis and Recommendations to Users. *Hum. Mutat.* **2002**, *19* (6), 607–614.
- (47) Joerger, A. C.; Fersht, A. R. Structural Biology of the Tumor Suppressor P53 and Cancer-Associated Mutants. *Adv. Cancer Res.* **2007**, *97*, 1–23.
- (48) 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.
- (49) Nemoto, S.; Fergusson, M. M.; Finkel, T. Nutrient Availability Regulates SIRT1 through a Forkhead-Dependent Pathway. *Science* **2004**, *306* (5704), 2105–2108.
- (50) 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).
- (51) Du, S.; Zheng, H. Role of FoxO Transcription Factors in Aging and Age-Related Metabolic and Neurodegenerative Diseases. *Cell Biosci.* **2021**, *11*, 188.
- (52) Szybińska, A.; Leśniak, L. P53 Dysfunction in Neurodegenerative Diseases - The Cause or Effect of Pathological Changes? *Aging Dis.* **2017**, *8* (4), 506.
- (53) Baker, D. J.; Wijshake, T.; Tchkonja, T.; LeBrasseur, N. K.; Childs, B. G.; van de Sluis, B.; Kirkland, J. L.; van Deursen, J. M. Clearance of P16Ink4a-Positive Senescent Cells Delays Ageing-Associated Disorders. *Nature* **2011**, *479* (7372), 232–236.
- (54) Kang, C. Senolytics and Senostatics: A Two-Pronged Approach to Target Cellular Senescence for Delaying Aging and Age-Related Diseases. *Mol. Cells* **2019**, *42*.
- (55) Kirkland, J. L.; Tchkonja, T. Senolytic Drugs: From Discovery to Translation. *J. Intern. Med.* **2020**, *288* (5), 518–536.
- (56) Zhang, L.; Pitcher, L. E.; Prahalad, V.; Niedernhofer, L. J.; Robbins, P. D. Recent Advances in the Discovery of Senolytics. *Mech. Ageing Dev.* **2021**, *200*, 111587.
- (57) Bruckheimer, E. M.; Cho, S. H.; Sarkiss, M.; Herrmann, J.; McDonnell, T. J. The Bcl-2 Gene Family and Apoptosis. In *Apoptosis*; Al-Rubeai, M., Ed.; Scheper, T., Babel, W., Blanch, H. W., Cooney, C. L., Enfors, S.-O., Eriksson, K.-E. L., Fiechter, A., Klibanov, A. M., Mattiasson, B., Primrose, S. B., Rehm, H. J., Rogers, P. L., Sahm, H., Schügerl, K., Tsao, G. T., Venkat, K., Villadsen, J., von Stockar, U., Wandrey, C.,

- Series Eds.; *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1998; Vol. 62, pp 75–105.
- (58) Zhu, Y.; Tchkonja, T.; Fuhrmann-Stroissnigg, H.; Dai, H. M.; Ling, Y. Y.; Stout, M. B.; Pirtskhalava, T.; Giorgadze, N.; Johnson, K. O.; Giles, C. B.; Wren, J. D.; Niedernhofer, L. J.; Robbins, P. D.; Kirkland, J. L. Identification of a Novel Senolytic Agent, Navitoclax, Targeting the Bcl-2 Family of Anti-apoptotic Factors. *Aging Cell* **2016**, *15* (3), 428–435.
- (59) Doti, N.; Mardirossian, M.; Sandomenico, A.; Ruvo, M.; Caporale, A. Recent Applications of Retro-Inverso Peptides. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (16), 8677.
- (60) He, Y.; Li, W.; Lv, D.; Zhang, X.; Zhang, X.; Ortiz, Y. T.; Budamagunta, V.; Campisi, J.; Zheng, G.; Zhou, D. Inhibition of USP7 Activity Selectively Eliminates Senescent Cells in Part via Restoration of P53 Activity. *Aging Cell* **2020**, *19* (3).
- (61) Lincová, D.; Farghali, Hassan. Ostatní látky s pozitivně ionotropním působením. In *Základní a Aplikovaná Farmakologie*, s. 211.; Praha: Galén, 2002.
- (62) Triana-Martínez, F.; Picallos-Rabina, P.; Da Silva-Álvarez, S.; Pietrocola, F.; Llanos, S.; Rodilla, V.; Soprano, E.; Pedrosa, P.; Ferreirós, A.; Barradas, M.; Hernández-González, F.; Lalinde, M.; Prats, N.; Bernadó, C.; González, P.; Gómez, M.; Ikononopoulou, M. P.; Fernández-Marcos, P. J.; García-Caballero, T.; del Pino, P.; Arribas, J.; Vidal, A.; González-Barcia, M.; Serrano, M.; Loza, M. I.; Domínguez, E.; Collado, M. Identification and Characterization of Cardiac Glycosides as Senolytic Compounds. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 4731.
- (63) González-Gualda, E.; Pàez-Ribes, M.; Lozano-Torres, B.; Macias, D.; Wilson, J. R.; González-López, C.; Ou, H.-L.; Mirón-Barroso, S.; Zhang, Z.; Lérida-Viso, A.; Blandez, J. F.; Bernardos, A.; Sancenón, F.; Rovira, M.; Fruk, L.; Martins, C. P.; Serrano, M.; Doherty, G. J.; Martínez-Mañez, R.; Muñoz-Espín, D. Galacto-Conjugation of Navitoclax as an Efficient Strategy to Increase Senolytic Specificity and Reduce Platelet Toxicity. *Aging Cell* **2020**, *19* (4), e13142.
- (64) Kumar, S.; Pandey, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci. World J.* **2013**, *2013*, 162750.
- (65) Volf, K.; Andrs, F. *Flavonoidy a Jejich Biologické Působení*; Česko, 2008.
- (66) Reyes-Farias, M.; Carrasco-Pozo, C. The Anti-Cancer Effect of Quercetin: Molecular Implications in Cancer Metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (13), E3177.
- (67) Xu, Q.; Fu, Q.; Li, Z.; Liu, H.; Wang, Y.; Lin, X.; He, R.; Zhang, X.; Ju, Z.; Campisi, J.; Kirkland, J. L.; Sun, Y. The Flavonoid Procyanidin C1 Has Senotherapeutic Activity and Increases Lifespan in Mice. *Nat. Metab.* **2021**, *3* (12), 1706–1726.
- (68) Gold Biotechnology. Purification of His-Tagged Target Proteins Using a Ni Resin [Scheme], [Online], [cit. 20.05.2022], dostupné z: <https://www.goldbio.com/documents/1047/Affinity%20His-Tag%20Purification%20Utilizing%20Chelating%20Agarose%20Beads.pdf>
- (69) McMurry, J. *Organická chemie*, 1st ed.; VŠCHT: Praha, 2015.
- (70) Dračinský, M. *NMR Spektroskopie pro Chemiky*; 2021.
- (71) Cavanagh, J.; Fairbrother, W. J.; Palmer, A. G.; Skelton, N. J.; Rance, M. *Protein NMR Spectroscopy*; Elsevier Inc.: Amsterdam, 2007.
- (72) Liang, B.; Bushweller, J. H.; Tamm, L. K. Site-Directed Parallel Spin-Labeling and Paramagnetic Relaxation Enhancement in Structure Determination of Membrane Proteins by Solution NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (13), 4389–4397.
- (73) Clore, G. M.; Iwahara, J. Theory, Practice and Applications of Paramagnetic Relaxation Enhancement for the Characterization of Transient Low-Population States

- of Biological Macromolecules and Their Complexes. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (9), 4108–4139.
- (74) Lee, W.; Tonelli, M.; Markley, J. L. NMRFAM-SPARKY: Enhanced Software for Biomolecular NMR Spectroscopy. *Bioinformatics* **2015**, *31* (8), 1325–1327.