

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

---



STUDIUM MECHANISMU ROZPOZNÁVÁNÍ DNA  
TRANSKRIPČNÍM FAKTOREM FOXO4

Study of the mechanism of DNA recognition by transcription factor  
FOXO4

Diplomová práce  
studijního oboru Biofyzikální chemie

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 30. srpna 2012.

## Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Tomášovi Obšilovi, Ph.D. za odborné vedení při práci na mém diplomovém projektu.

Dále děkuji Mgr. Petru Váchovi za pomoc a řadu cenných rad a Mgr. Ladislavu Bumbovi, Ph.D. za měření rezonance povrchového plasmonu.

Děkuji také celému kolektivu studentů z Laboratoře biofyzikální chemie a z Oddělení proteinových struktur Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i. za vytvoření přátelského prostředí a za trpělivou pomoc při práci v laboratoři.

Na závěr mé poděkování patří mým rodičům a blízkým za poskytnuté zázemí a podporu během celého studia.

## ABSTRAKT

Forkhead transkripční faktor FOXO4 se podílí na kontrole řady buněčných dějů, jako jsou např. metabolismus, buněčný cyklus, apoptóza, oprava poškozené DNA či ochrana vůči oxidativnímu stresu. Krystalová struktura DNA-vazebné domény tohoto proteinu s navázanou DNA ukázala, že FOXO4 interaguje s DNA podobně jako jiné forkhead proteiny. DNA-vazebný povrch je tvořen zejména helixem H3, který se váže do velkého žlábků molekuly DNA, a dále N-koncovým segmentem a flexibilními ohyby na C-konci domény. Nicméně řada otázek, zejména ohledně mechanismu regulace specifčnosti při rozpoznávání DNA a úlohy jednotlivých částí domény v tomto procesu, zůstává stále nejasná. V rámci této diplomové práce byla studována interakce DNA-vazebné domény FOXO4 s DNA o různých sekvencích. Tento protein a řada jeho mutantů byla exprimována a purifikována a interakce s DNA byly studovány pomocí metod fluorescenční spektroskopie a resonance povrchového plasmonu. Výsledky těchto experimentů ukázaly, že nukleotidová sekvence na 5' konci od hlavního vazebného motivu ovlivňuje stabilitu komplexu DNA-vazebné domény FOXO4:DNA. Dále se podařilo objasnit význam jednotlivých aminokyselin FOXO4, které se podílejí na vazbě na DNA, na stabilitě výsledného komplexu.

## **ABSTRACT**

Forkhead transcription factor FOXO4 is involved in a wide range of processes including metabolism control, cell cycle regulation, apoptosis, DNA repair or oxidative stress resistance. The crystal structure of FOXO4 DNA-binding domain bound to the target DNA revealed that FOXO4 interacts with DNA in the same manner as other forkhead proteins. The DNA-binding interface consists of helix H3, which binds to the major groove of DNA, the N-terminal segment and flexible loops located at the C-terminus of forkhead domain. However, many questions concerning the regulation of DNA-binding specificity and the role of different parts of forkhead domain in this process remain elusive. In this diploma thesis, the interactions between the DNA-binding domain of FOXO4 and DNA with various sequences were studied. The DNA-binding domain of FOXO4 and its mutants were expressed and purified and their DNA-binding properties were studied using fluorescence spectroscopy techniques and surface plasmon resonance. Results of these experiments revealed that the nucleotide sequence at the 5' end of the consensus binding motif affects the stability of the complex between the DNA-binding domain of FOXO4 and DNA. In addition, the importance of individual amino acid residues of FOXO4 that are involved in DNA binding for the stability of the FOXO4:DNA complex was clarified.

# OBSAH

<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>8</b>
<b>1 Úvod</b> .....	<b>10</b>
<b>2 Literární přehled</b> .....	<b>12</b>
2.1 Transkripce a její regulace transkripčními faktory .....	12
2.2 Forkhead transkripční faktory.....	14
2.3 FOXO transkripční faktory.....	15
2.3.1 Biologický význam FOXO proteinů .....	16
2.3.2 Struktura FOXO proteinů .....	16
2.3.3 Regulace funkce FOXO proteinů .....	19
2.4 Interakce proteinů s DNA .....	20
2.4.1 Interakce FOXO proteinů s DNA.....	23
2.4.2 Interakce proteinu FOXO4 s DNA.....	27
<b>3 Cíle práce</b> .....	<b>30</b>
<b>4 Materiály a metody</b> .....	<b>31</b>
4.1 Použitý materiál .....	31
4.1.1 Chemikálie.....	31
4.1.2 Přístroje .....	33
4.1.3 Ostatní .....	34
4.2 Příprava plasmidové DNA nesoucí mutovanou formu genu pro protein FOXO4 82–207	34
4.2.1 Vnesení mutace do sekvence plasmidové DNA.....	35
4.2.2 Horizontální agarózová elektroforéza .....	36
4.2.3 Amplifikace zmutované plasmidové DNA.....	37
4.2.4 Izolace zmutované plasmidové DNA .....	38
4.3 Exprese FOXO4 82–207.....	38
4.3.1 Kultivace bakterií a indukce exprese.....	39
4.3.2 Sonikace .....	39
4.4 Purifikace FOXO4 82–207 .....	40
4.4.1 Niklová chelatační chromatografie.....	41
4.4.2 Dialýza.....	42
4.4.3 Kationtově výměnná chromatografie .....	43
4.4.4 Gelová permeační chromatografie .....	45
4.4.5 SDS-PAGE.....	46

4.4.6	Určení koncentrace proteinů.....	49
4.5	Studium interakcí mezi FOXO4 82–207 a DNA.....	50
4.5.1	Příprava dvojvláknové DNA (dsDNA) z oligonukleotidů .....	50
4.5.2	Nativní elektroforéza .....	50
4.5.3	Stacionární anizotropie fluorescence.....	52
4.5.4	Rezonance povrchového plasmonu .....	55
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>58</b>
5.1	Příprava plasmidové DNA nesoucí mutacní formy genu pro protein FOXO4 82–207	58
5.2	Purifikace proteinů FOXO4 82–207 .....	58
5.2.1	Niklová chelatační chromatografie.....	59
5.2.2	Kationtově výměnná chromatografie .....	60
5.2.3	Gelová permeační chromatografie .....	62
5.3	Srovnání vazebné afinity proteinu FOXO4 82–207 k různým dsDNA lišícím se v sekvenci předcházející hlavní vazebný motiv.....	63
5.3.1	Nativní elektroforéza .....	64
5.3.2	Stacionární anizotropie fluorescence.....	67
5.4	Porovnání DNA-vazebné afinity proteinů FOXO4 82–207 nesoucích vybrané bodové mutace .....	72
5.4.1	Rezonance povrchového plasmonu .....	72
5.4.2	Stacionární anizotropie fluorescence.....	77
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>Seznam citované literatury .....</b>	<b>86</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APS	peroxidisíran amonný
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CDK2	cyklin-dependentní kinasa 2
cGK1	cGMP-dependentní kinasa 1
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
DBD	DNA-vazebná doména (z angl. DNA-binding domain)
dsDNA	dvojvláknová DNA (z angl. double-stranded DNA)
DTT	1,4-dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
Flc	fluorescein
IGF1	insulinu podobný růstový faktor 1 (z angl. insulin-like growth factor 1)
IGFBP1	insulinu podobný růstový faktor vázající protein 1 (z angl. insulin-like growth factor-binding protein 1)
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
LB	Luria-Bertani
mRNA	messenger RNA
MST1	savčí Ste20 podobná kinasa 1 (z angl. mammalian Ste20-like kinase 1)
NES	jaderná exportní sekvence (z angl. nuclear export sequence)
NLS	jaderný lokalizační signál (z angl. nuclear localization signal)
PAGE	elektroforéza v poly(akrylamid)ovém gelu
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)

PKB/Akt	proteinkinasa B
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
rpm	otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
rRNA	ribozomální RNA
SDS	dodecylsírán sodný
smh	standard molekulových hmotností
SPR	rezonance povrchového plasmonu (z angl. surface plasmon resonance)
TA-doména	transaktivační doména
TEMED	N,N,N',N'-tetraethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transferová RNA
v/v	objem/objem (z angl. volume/volume)
w/v	hmotnost/objem (z angl. weight/volume)
WT	přirozený typ (z angl. wild type)
βME	2-thioethanol

# 1 ÚVOD

Protein FOXO4 je transkripční aktivátor z podskupiny „O“ forkhead transkripčních faktorů (FOXO). Transkripční faktory jsou proteiny, které se účastní transkripce a ovlivňují míru exprese genů.

Forkhead proteiny byly poprvé identifikovány v roce 1988 v raném stadiu embryí *Drosophila melanogaster* (Jürgens a Weigel, 1988) a o dva roky později byly tyto proteiny definovány jako nová skupina transkripčních faktorů (Weigel a Jäckle, 1990). Své jméno forkhead transkripční faktory dostaly na základě vlivu mutace ve forkhead genu na konečný embryonální vývoj u *Drosophila melanogaster* – forkhead = vidličková hlava (Jürgens a Weigel, 1988). Nyní již známe více než sto zástupců transkripčních faktorů skupiny forkhead rozdělených do 17 podskupin, které byly nalezeny ve všech živočišných druzích od kvasinek po člověka, přičemž skupina lidských forkhead proteinů má 43 dosud identifikovaných členů.

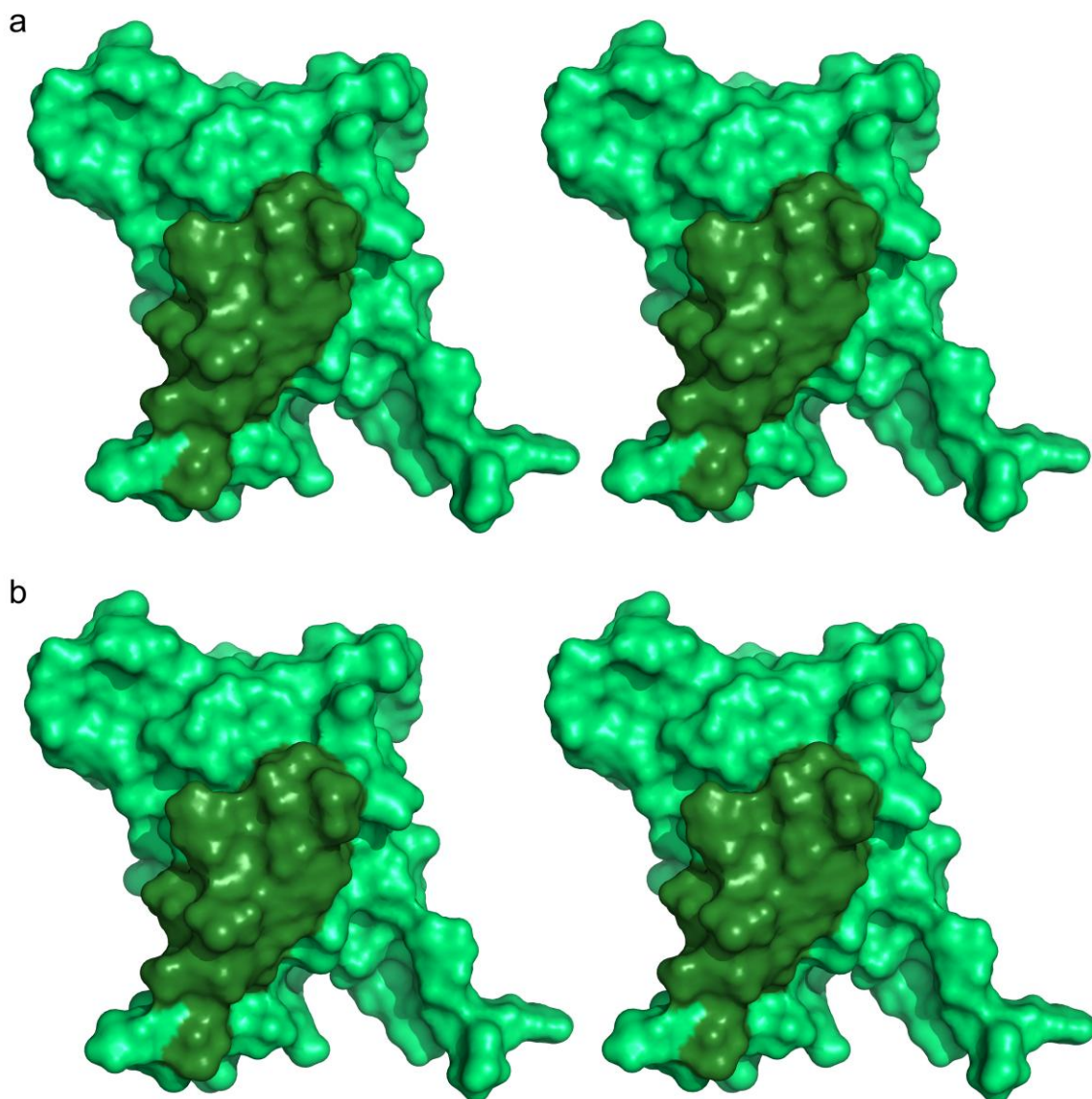
Forkhead transkripční faktory mají široký biologický význam, hrají ústřední roli v mnoha rozličných buněčných pochodech, jako je diferenciace, proliferace, kontrola metabolismu, apoptóza, odolávání stresu a tumorogeneze (Kaufmann a Knöchel, 1996; Carlsson a Mahlapuu, 2002).

Podskupina „O“ forkhead transkripčních faktorů má čtyři členy, jsou to FOXO1, FOXO3, FOXO4 a FOXO6. FOXO proteiny mají zásadní význam při regulaci životního cyklu buněk, účastní se procesů jako je buněčná proliferace, buněčný metabolismus, apoptóza, oprava poškozené DNA a obrana vůči stresu (Burgering, 2008). Působení FOXO faktorů bývá také spojováno s dlouhověkostí, vliv FOXO proteinů na délku života byl prokázán u modelového organismu *Caenorhabditis elegans* (Lin *et al.*, 1997).

Všechny forkhead transkripční faktory obsahují charakteristický evolučně konzervovaný DNA-vazebný motiv, známý jako forkhead doména, který je tvořen sekvencí přibližně 110 aminokyselin (Weigel a Jäckle, 1990). Skrze tuto DNA-vazebnou doménu se forkhead proteiny váží na specifickou sekvenci v molekule DNA. Hlavní vazebný motiv, který rozpoznávají všechny forkhead proteiny, je 5'-(A/C)AA(C/T)A-3' (Overdier *et al.*, 1994). Ovšem mechanismus jakým různé podskupiny forkhead proteinů rozpoznávají rozdílné DNA sekvence přilehlé k hlavnímu vazebnému motivu je stále nejasný. Experimenty provedené v rámci této diplomové práce a také širšího projektu

laboratoře byly zaměřeny na objasňování zmíněného mechanismu. Pro studium byl vybrán člen podskupiny „O“ FOXO4, přesněji pouze jeho DNA-vazebná doména.

Pro představu, jak by DNA-vazebná doména proteinu FOXO4 vypadala, kdybychom se na ni mohli podívat, slouží obr. 2.2, na kterém je stereo zobrazení této molekuly, které nám umožňuje vytvoření iluze trojrozměrného prostoru.



**Obr. 2.2** Stereo zobrazení povrchu DNA-vazebné domény FOXO4 (Weigelt *et al.*, 2001). (a) „Cross-eyed“ zobrazení. (b) „Wall-eyed“ zobrazení. Tmavě zelenou barvou je reprezentována nejvíce konzervovaná část molekuly. Tento obrázek byl vytvořen pomocí programu PyMOL verze 0.99rc6 (<http://www.pymol.org>).

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Transkripce a její regulace transkripčními faktory

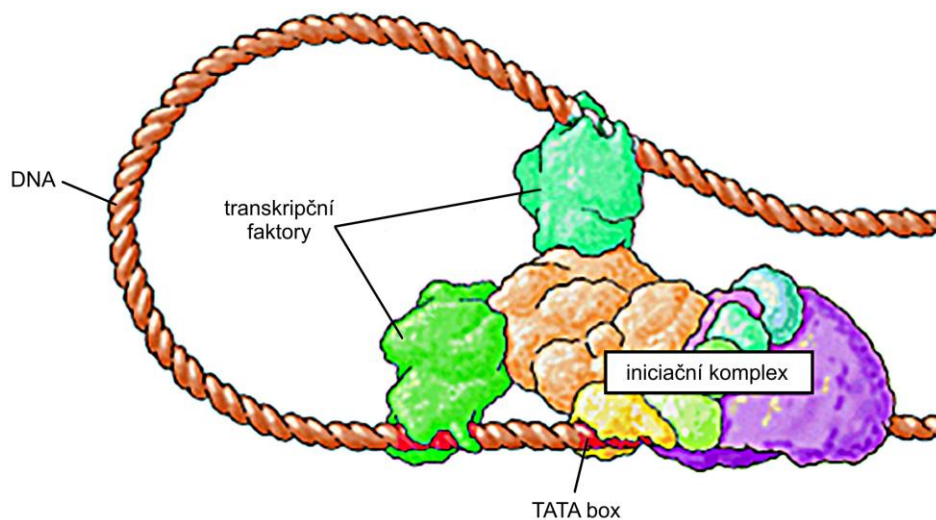
Transkripce je biologický děj probíhající u eukaryot v jádře buňky, je to první krok tzv. exprese genu, při které jsou na základě genetické informace syntetizovány proteiny. Při transkripci dochází k postupnému rozplétání dvojvláknové molekuly DNA, přičemž jedno vlákno, tzv. templát, je použito jako šablona pro syntézu vlákna RNA, které je pak komplementární k DNA templátu. Existují tři hlavní typy RNA – mRNA (messenger RNA), tRNA (transferová RNA) a rRNA (ribosomální RNA), ovšem pouze mRNA specifikuje aminokyselinovou sekvenci příslušného proteinu. tRNA jsou molekuly, které při translaci připojují specifické aminokyseliny na rostoucí polypeptidový řetězec. rRNA je druh RNA, který spolu s určitými proteiny tvoří strukturu ribosomů, na kterých dochází k translaci.

Transkripci můžeme rozdělit na tři fáze – iniciační, elongační a terminační. Klíčovým enzymem transkripčního procesu je RNA polymerasa. U eukaryotických buněk existuje více typů RNA polymerasy, přičemž DNA kódující proteiny přepisuje RNA polymerasa II. V iniciační fázi se RNA polymerasa II naváže na oblast promotoru DNA – sekvence, která určuje místo započetí transkripce – a za účasti TATA-box vazebného proteinu a obecných transkripčních faktorů otevře DNA duplex. Poté RNA polymerasa II katalyzuje vznik první fosfodiesterové vazby mezi dvěma iniciačními ribonukleotidtrifosfáty, z nichž je tvořen řetězec molekuly RNA. Během elongační fáze RNA polymerasa II postupuje po templátovém vláku DNA od 3' konce k 5' konci, postupně otevírá DNA duplex a připojuje ribonukleotidtrifosfáty na rostoucí RNA, čímž vzniká nascentní pre-mRNA, která musí projít několika modifikacemi (RNA processing), jež vedou ke vzniku funkční mRNA. Když RNA polymerasa II narazí na specifickou terminační sekvenci, uvolní kompletní pre-mRNA, a poté sama disociuje od DNA. Tento proces se nazývá terminační fáze transkripce.

Vzhledem k tomu, že je nežádoucí, aby v buňkách především mnohobuněčných organismů, byly veškeré geny přepisovány na mRNA a následně syntetizovány proteiny, je transkripce velmi přísně regulována. Jedním z mechanismů regulace transkripce u eukaryot

je vazba transkripčních faktorů na specifické sekvence DNA. Existuje skupina tzv. obecných transkripčních faktorů, které se váží na oblast promotoru a interagují s RNA polymerasou II, a tato jejich vazba je nezbytná pro započetí transkripce všech genů. Dále existují různé skupiny transkripčních faktorů, které regulují transkripci (aktivují ji či inhibují) pouze určité skupiny genů. Váží se na specifickou DNA sekvenci, hlavní vazebný motiv, která je často vzdálená od genu, jehož transkripci regulují. Jednou z takovýchto skupin jsou i tzv. forkhead transkripční faktory.

Všechny transkripční faktory mají čtyři základní části, jsou to DNA-vazebná doména (DBD), aktivační doména, jaderný lokalizační signál a regulační elementy. Transkripční faktor se váže skrze svou DBD na specifickou sekvenci DNA a skrze aktivační doménu interaguje s RNA polymerasou II a moduluje její funkci, jak znázorňuje obr. 2.1. Jaderný lokalizační signál zajišťuje transport transkripčního faktoru do jádra buňky, kde probíhá transkripce a kde tedy může zastat svou funkci. Regulační elementy slouží k regulaci funkce transkripčního faktoru.



**Obr. 2.1** Znázornění působení transkripčních faktorů. Před započítím transkripce je nutná vazba TATA box-vázcího proteinu na specifickou sekvenci DNA známou jako TATA box, vazba tohoto proteinu způsobí významný ohyb DNA. Následuje vazba několika obecných transkripčních faktorů a RNA polymerasy II, které spolu tvoří transkripční iniciační komplex. Transkripční faktory, které jednou svou částí vytvářejí kontakt s DNA a další částí s RNA polymerasou II, mohou aktivovat či inhibovat transkripci specifických genů (Cooper, 2000).

## 2.2 Forkhead transkripční faktory

Forkhead geny byly poprvé objeveny v embryích *Drosophila melanogaster*. Jsou to oblastně specifické homeotické geny, jejichž mutace v *Drosophila melanogaster* vede k nesprávné konečné stavbě embrya (Jürgens a Weigel, 1988). Tyto forkhead geny kódují forkhead proteiny, které působí v jádrech buněk jako transkripční faktory (Weigel a Jäckle, 1990).

Forkhead proteiny jsou strukturně podobné transkripční aktivátory, které byly identifikovány v celé škále druhů od kvasinek až po člověka (Clark *et al.*, 1993).

Forkhead transkripční faktory obsahují charakteristický DNA-vazebný, motiv tvořený přibližně 110 aminokyselin dlouhou sekvencí, zvaný forkhead doména (Weigel a Jäckle, 1990) a tvoří samostatnou skupinu uvnitř nadrodiny tzv. „okřídlených helikálních proteinů“ (z angl. winged-helix proteins). Aminokyselinová sekvence forkhead domény, sestávající se ze tří  $\alpha$ -helixů (H1, H2 a H3), tří  $\beta$ -vláken (S1, S2 a S3) a dvou flexibilních ohybů tvarem připomínajících motýlí křídla (W1 a W2), je vysoce konzervovaná napříč živočišnými druhy (Clark *et al.*, 1993).

Forkhead transkripční faktory hrají zásadní roli v mnoha různých buněčných pochodech, uplatňují se především při kontrole metabolismu buněk, v buněčném vývoji, proliferaci, diferenciaci, apoptóze, odolnosti vůči stresu a tumorogenezi (Kaufmann a Knöchel, 1996; Carlsson a Mahlapuu, 2002).

V současnosti již bylo identifikováno více než sto různých forkhead transkripčních faktorů, které byly rozřazeny do 17 podskupin značených písmeny A až Q. Zdá se, že během evoluce počet forkhead genů rostl, v obratlovcích bylo identifikováno více různých genů ze skupiny forkhead než u bezobratlých. A skupina lidských forkhead genů obsahuje nejméně 43 členů (Burgering, 2008).

Forkhead transkripční faktory se také označují Fox (forkhead box) faktory. Jednotlivé Fox proteiny jsou rozřazeny do podskupin na základě fylogenetické analýzy a tyto podskupiny jsou označeny písmeny, jednotlivé členy těchto podskupin jsou pak značeny číslovkami na konci. Správná nomenklatura pro Fox proteiny je psát všechna písmena velká, pokud se jedná o lidský forkhead transkripční faktor, např. FOXO4, pouze první písmeno velké pro myší Fox faktory, např. Foxd3, a první písmeno a písmeno podskupiny velké pro Fox faktory všech ostatních strunatců, např. FoxA3 (Kaestner *et al.*, 2000).

## 2.3 FOXO transkripční faktory

FOXO transkripční faktory jsou podskupinou „O“ forkhead transkripčních faktorů. Poprvé byly identifikovány v lidských alveolárních rhabdomyosarkomech (Galili *et al.*, 1993).

FOXO faktory vyskytující se v obratlovcích jsou homologní k transkripčnímu faktoru DAF-16 nalezenému v bezobratlém živočichu *Caenorhabditis elegans*. DAF-16 u *Caenorhabditis elegans* ovlivňuje délku života tohoto organismu a řídí formování dauer larvy (Lin *et al.*, 1997) – alternativní vývojové stádium, ve kterém larva může přežít jinak nesnesitelné podmínky.

Členy podskupiny „O“ forkhead transkripčních faktorů se uplatňují v řadě zásadních biologických procesů. Hrají stěžejní roli v kontrole buněčného cyklu, diferenciaci, kontrole buněčného metabolismu, apoptóze, opravě poškozené DNA a ochraně vůči oxidativnímu stresu. Aktivita FOXO proteinů musí být přísně kontrolována, děje se tak především regulací jejich vnitrobuněčné lokalizace, ale také působením na jejich DNA-vazebné vlastnosti a transkripční aktivitu (Burgering, 2008).

FOXO podskupina forkhead transkripčních faktorů má čtyři členy, jsou to: FOXO1, FOXO3, FOXO4 a FOXO6. Pro FOXO1, FOXO3, FOXO4 existují alternativní jména používaná ve starších studiích: FKHR pro FOXO1, FKHRL1 pro FOXO3 a AFX nebo Mllt7 pro FOXO4. Existuje také transkripční faktor FoxO5, který je exprimován pouze u *Danio rerio* (Burgering, 2008). Exprese FOXO1, FOXO3 a FOXO4 je všudypřítomná, její míra se však značně liší v různých orgánech. FOXO1 je ve vyšší míře exprimován v hnědé a bílé tukové tkáni a ve slezině, v malé míře byl detekován také v kosterním svalstvu. FOXO3 je ve vyšší míře exprimován v srdci, mozku, slezině a ledvinách. FOXO4 je ve vysoké míře exprimován v srdci a kosterním svalstvu, dále také v hnědé a bílé tukové tkáni. FOXO1, FOXO3 i FOXO4 byly v menší míře detekovány i v játrech (Furuyama *et al.*, 2000). Exprese FOXO6 je omezená pouze na mozek (Jacobs *et al.*, 2003).

### 2.3.1 Biologický význam FOXO proteinů

FOXO transkripční faktory podněcují děje zásadní pro přežití organismů jako zastavení buněčného cyklu, opravení poškozené DNA, detoxikaci od kyslíkových radikálů, apoptózu a autofagii (lysozomální rozklad proteinů) a to specifickým zvýšením genové exprese (Brunet *et al.*, 1999).

Zastavení buněčného cyklu a apoptóza vyvolané FOXO proteiny mohou být kritické pro tumor-supresivní efekt těchto transkripčních faktorů, zatímco FOXO proteiny indukovaná rezistence vůči oxidativnímu stresu se může podílet na prodloužení délky života organismů (Calnan a Brunet, 2008).

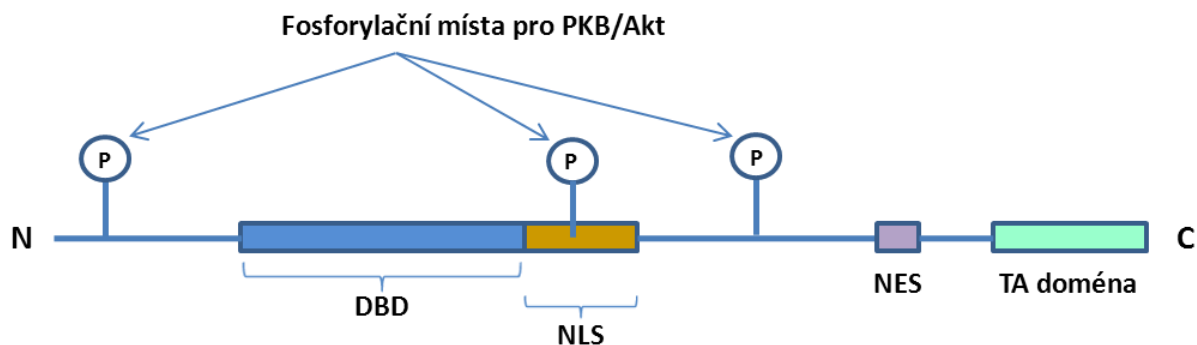
FOXO proteiny také regulují buněčnou diferenciaci v krvi, svalech a tukové tkáni, což může přispívat k jejich roli ve vývoji (Hribal *et al.*, 2003; Nakae *et al.*, 2003).

A v neposlední řadě FOXO proteiny kontrolují buněčný metabolismus tím, že podporují glukoneogenezi a zvyšují příjem potravy (Puigserver *et al.*, 2003).

Vzhledem k tomu, že funkce FOXO transkripčních faktorů v buňkách jsou různorodé a někdy dokonce protikladné, je pravděpodobné, že aktivita těchto proteinů bude v jednotlivých tkáních regulována různě jako odpověď na působení rozmanitých typů vnějších stimulů (Calnan a Brunet, 2008).

### 2.3.2 Struktura FOXO proteinů

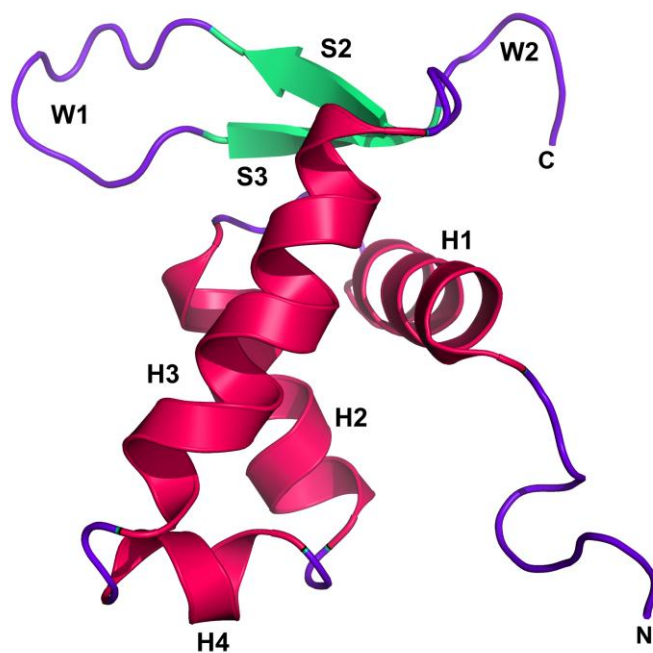
FOXO proteiny se skládají ze čtyř částí, jsou to: (i) vysoce konzervovaná forkhead DBD; (ii) jaderný lokalizační signál, který se nachází za DBD; (iii) jaderná exportní sekvence a (iv) C-terminální transaktivační doména. Schématické znázornění primární struktury je na obr. 2.3. Proteiny FOXO1, FOXO3 a FOXO6 mají podobnou délku okolo 650 aminokyselin, zatímco protein FOXO4 je kratší a obsahuje přibližně 500 aminokyselin, a všechny obsahují tři fosforylační místa pro proteinkinasu B (PKB nebo také Akt). Některé oblasti FOXO proteinů jsou vysoce konzervované, jsou to především N-koncová oblast okolo prvního fosforylačního místa pro PKB/Akt, forkhead DBD a oblast obsahující jaderný lokalizační signál a část C-terminální transaktivační domény (Obšil a Obšilová, 2008).



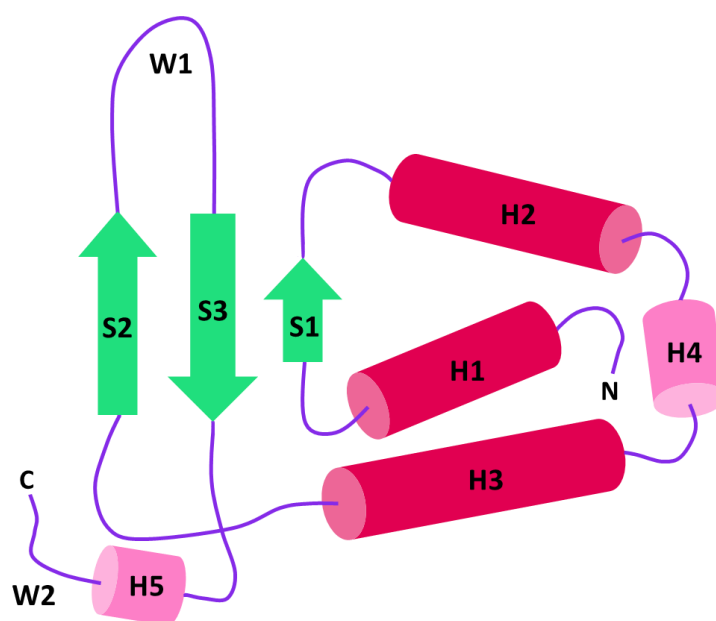
**Obr. 2.3** Schématické znázornění primární struktury FOXO proteinů. Všechny FOXO proteiny mají stejné doménové uspořádání a obsahují forkhead DNA-vazebnou doménu (DBD), jaderný lokalizační signál (NLS), jadernou exportní sekvenci (NES) a transaktivační (TA) doménu. Vyznačena jsou také fosforylační místa pro proteinkinasu B (PKB/Akt) (Obšil a Obšilová, 2008).

Forkhead DBD obsahuje přibližně 110 aminokyselin, řetězec se skládá do tří  $\alpha$ -helixů (H1, H2 a H3), tří  $\beta$ -vláken (S1, S2 a S3) a dvou ohybů tvaru motýlích křídel (W1 a W2). Stuhová reprezentace trojrozměrné struktury forkhead domény (sekvence 92–181) proteinu FOXO4 je na obr. 2.4. Topologické uspořádání je H1–S1–H2–H3–S2–W1–S3–W2 a je graficky znázorněno na obr. 2.5.  $\beta$ -vlákno S1, vložené mezi helixy H1 a H2, interaguje s vlákny S2 a S3, čímž je utvořen třívláknový, stočený, antiparalelní  $\beta$ -list (Clark *et al.*, 1993). Forkhead doména proteinu FOXO4 (Weigelt *et al.*, 2001) (a také některých dalších forkhead faktorů FoxD3 (Marsden *et al.*, 1998), FOXC2 (van Dongen *et al.*, 2000) a FoxQ1 (Sheng *et al.*, 2002)) obsahuje navíc krátký  $3_{10}$ -helix (H4) umístěný mezi  $\alpha$ -helixy H2 a H3. Struktury komplexů DNA s DBD forkhead proteinů náležících do jiných podskupin než je podskupina „O“ (FoxD3 (Jin a Liao, 1999), FOXK1a (Tsai *et al.*, 2006) a FOXP2 (Stroud *et al.*, 2006)) ukázaly přítomnost dalšího helixu (H5) v C-koncové části forkhead domény za  $\beta$ -vláknem S3.

Hlavním DNA-rozpoznávacím místem forkhead domény je helix H3, který interaguje s velkým žlábkem DNA (Clark *et al.*, 1993). Helix H3 je zároveň nejvíce konzervovanou oblastí uvnitř forkhead domény (Tsai *et al.*, 2007). Další oblasti forkhead domény, které mohou tvořit významné vazebné kontakty, jsou oba flexibilní ohyby W1 a W2 (Clark *et al.*, 1993) a také N-koncový segment před helixem H1 (Zheng *et al.*, 1999).



**Obr. 2.4** Stuhová reprezentace trojrozměrné struktury forkhead domény (sekvence 92–181) proteinu FOXO4 (Weigelt *et al.*, 2001). Tento obrázek byl vytvořen pomocí programu PyMOL verze 0.99rc6 (<http://www.pymol.org>).



**Obr. 2.5** Topologické zobrazení forkhead domény. Helixy H4 a H5 jsou přítomny ve forkhead doméně jen některých forkhead proteinů (Clark *et al.*, 1993; Obšil a Obšilová, 2008).

### 2.3.3 Regulace funkce FOXO proteinů

Regulace funkce FOXO transkripčních faktorů je založena především na jejich transportu z jádra do cytoplasmy a naopak. Je zajištěna širokou škálou protein-proteinových interakcí a posttranslačních modifikací zahrnující fosforylaci, acetylaci a ubiquitinaci (Greer a Brunet, 2005). Několik míst pro posttranslační modifikace je umístěno uvnitř nebo blízko DBD FOXO faktorů, a tím je umožněna regulace interakce molekuly FOXO s DNA jak přímo, tak i vytvořením specifického vazebného motivu pro FOXO vazebné partnery.

FOXO proteiny jsou součástí insulin/IGF1<sup>1</sup> signální dráhy, skrze niž je jejich transkripční aktivita negativně regulována fosforylací tří konzervovaných serinových a threoninových zbytků PKB/Akt. U proteinu FOXO4 to jsou T28, S193 a S258 (Kops *et al.*, 1999). Sama fosforylace enzymem PKB/Akt má pouze malý efekt na DNA-vazebnou afinitu FOXO proteinů (Boura *et al.*, 2007). Ovšem fosforylací dvou z těchto tří PKB/Akt-fosforylačních míst vzniká vazebný motiv pro regulační proteiny 14-3-3 (Brunet *et al.*, 1999). První z těchto dvou míst je v N-terminální části molekuly FOXO a druhé je umístěno v segmentu W2 forkhead domény.

Proteiny 14-3-3 jsou skupinou vysoce konzervovaných kyselých regulačních proteinů. Jejich funkce je založena na schopnosti vázat jiné proteiny, většinou způsobem závislým na fosforylaci cílového proteinu, a cestou konformačních změn regulovat jejich funkci (Muslin *et al.*, 1996).

Fosforylací indukovaná vazba proteinu 14-3-3 inhibuje vazbu FOXO na cílovou DNA a způsobuje také rychlý transport FOXO proteinů z jádra a jejich zadržení v cytoplasmě (Brunet *et al.*, 1999).

Protein FOXO1 je regulován také fosforylací cGMP<sup>2</sup>-dependentní kinasou 1 (cGK1). Tato fosforylace ruší DNA vazebnou aktivitu FOXO1 během fúze svalových buněk. cGK1 fosforyluje shluk serinových zbytků před helixem H1 (S152 – S155) a S184 na N-konci helixu H2. Ovšem tento způsob regulace se zdá být specifický pro protein FOXO1, shluk serinových zbytků před helixem H1 se u ostatních členů skupiny FOXO nevyskytuje a S184 chybí v sekvenci proteinu FOXO4 (Bois *et al.*, 2005).

---

<sup>1</sup> IGF1 je insulinu podobný růstový faktor (z angl. insulin-like growth factor 1).

<sup>2</sup> cGMP je cyklický guanosinmonofosfát.

Další kinasa fosforylující forkhead doménu FOXO transkripčních faktorů je MST1<sup>3</sup>, která je regulovaná oxidativním stresem. Fosforylace indukovaná MST1 způsobuje rozpad komplexu FOXO:14-3-3, a tím podněcuje transport FOXO proteinů do jádra (Lehtinen *et al.*, 2005).

Forkhead doména proteinu FOXO1 je fosforylována také cyklin-dependentní kinasou 2 (CDK2) na místě S249 v segmentu W2, což vede k zadržení FOXO1 v cytoplasmě a k regulaci jeho funkce (Huang *et al.*, 2006). Avšak DNA vazebná afinita FOXO1 zůstane nezměněná u mutantu S249E, kde je napodobena fosforylace na tomto místě, a tedy regulace FOXO1 není způsobena samotnou fosforylací S249 (Brent *et al.*, 2008). Inhibice funkce FOXO1 zprostředkovaná CDK2 je pravděpodobně způsobena jiným mechanismem, např. interferencí s přilehlým jaderným lokalizačním signálem (Huang *et al.*, 2006; Obšil a Obšilová, 2011).

C-konec DNA-vazebné domény FOXO proteinů (segment W2) obsahuje čtyři místa, která mohou být acetylována histonacetyltransferasami jako jsou p300 a CBP<sup>4</sup> (Daitoku *et al.*, 2004; Fukuoka *et al.*, 2003). Acetylace na těchto místech nebo odstranění kladného náboje mutagenézí způsobuje částečný pokles DNA vazebné afinity FOXO faktorů (Matsuzaki *et al.*, 2005).

## 2.4 Interakce proteinů s DNA

Na specifických interakcích proteinů s DNA je založeno mnoho biologických procesů. Mechanismy interakcí proteinů s DNA, jsou stále předmětem výzkumu. Jedna z nejdůležitějších otázek se týká specifičnosti – jak mnoho různých DNA-vázících proteinů, vyskytujících se v eukaryotických organismech, rozpoznává jejich specifické vazebné místo. Většina DNA-vázících proteinů je dokonce součástí velkých skupin, jejichž DBD je evolučně konzervovaná a má velmi podobné biochemické vlastnosti (Rohs *et al.*, 2010).

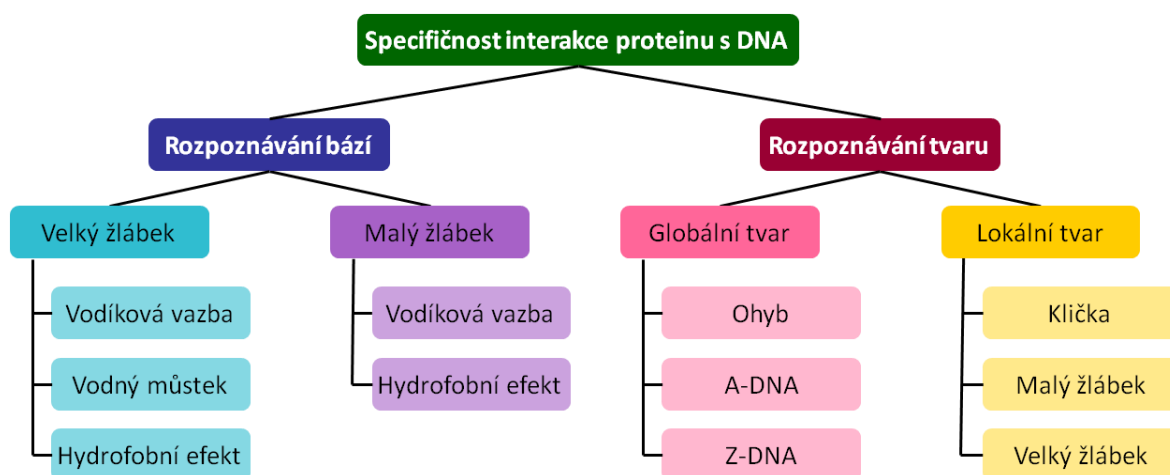
---

<sup>3</sup> MST1 je savčí Ste20-podobná kinasa 1 (z angl. mammalian Ste20-like kinase 1), Ste20 je serin/threonin proteinkinasa.

<sup>4</sup> CBP je CREB-vázající protein (z angl. CREB-binding protein), CREB je transkripční faktor, který se váže na sekvenci zvanou cAMP response element (z angl. cAMP-response element-binding), cAMP je cyklický adenosinmonofosfát.

Interakce proteinů s DNA leží na souhře dvou rovnocenných partnerů, DNA a proteinu. Obě tyto biomakromolekuly mají vlastní charakteristické třídimensionální struktury, které se musí navzájem přizpůsobit pro dosažení specifčnosti (Rohs *et al.*, 2010).

Interakce proteinů s DNA můžeme rozdělit do dvou kategorií: (i) interakce, kde protein rozpoznává unikátní chemický otisk basí DNA (rozpoznávání bází) a (ii) interakce, kde protein rozpoznává tvar DNA daný sekvencí (rozpoznávání tvaru). Interakce typu (i) dále dělíme na interakce ve velkém žlábků DNA a na interakce v malém žlábků DNA. Interakce typu (ii) můžeme rozdělit na interakce, kde je rozpoznáván globální tvar DNA, a na interakce, kde je rozpoznáván určitý lokální tvar DNA (Rohs *et al.*, 2010). Na obr. 2.6 je souhrn typů mechanismů rozpoznávání DNA proteiny, které proteinům umožňují dosáhnout jejich pozoruhodné DNA-vazebné specifčnosti.



**Obr. 2.6** Typy mechanismů rozpoznávání DNA proteiny (Rohs *et al.*, 2010).

Proteiny využívají k rozpoznávání DNA široké škály DNA-vazebných strukturních motivů jako je např. helix-otočka-helix motiv. Mnoho proteinů obsahuje také flexibilní segmenty, které zprostředkovávají důležité specifické i nespecifické interakce. Tyto flexibilní oblasti, které nemusí být vždy součástí striktně definované DBD, mohou mít esenciální roli v DNA-vazebné specifčnosti (Rohs *et al.*, 2010).

DNA je molekula nesoucí svou informaci zakódovanou do sledu bází A, C, G a T, ovšem nahlížet na ni jako na jednodimensionální řetězec obsahující pouze čtyři znaky není správné. Tyto báze, řazené na cukr-fosfátové kostře, jsou chemické subjekty, které vytvářejí třídimensionální dvouvláknovou strukturu, kde každý pár bází má specifický chemický a konformační otisk. DNA struktury se mění způsobem závislým na sekvenci a

tyto strukturální variace proteiny využívají k rozpoznávání DNA sekvence. DNA mění svůj tvar v globálním i lokálním měřítku. Variace globálního tvaru DNA zahrnují především mnohotvárnost dvojité šroubovice DNA – B-DNA, A-DNA, TA-DNA (obměna A-DNA pozorovaná v TATA-boxech specificky rozpoznávaných TATA-box-vazebným proteinem) a Z-DNA. Na rozdíl od obměn globálního tvaru DNA, variace lokálního tvaru DNA jsou odchylky od ideální B-DNA na úrovni jednotlivých párů bází (např. klička (angl. kink)) nebo se týkají jen malé oblasti dvojšroubovice (např. zúžení malého žlábků) (Rohs *et al.*, 2010).

Krystalové struktury komplexů proteinů s DNA často odhalují uspořádané molekuly vody na rozhraní mezi proteinem a DNA. Tyto molekuly vody mohou být pozůstatky solvatačních obalů jednotlivých makromolekul před vzájemnou interakcí, mohou fungovat jako výplň mezer mezi proteinem a DNA, vzniklých z nedokonalého zapadnutí povrchů do sebe, pro udržení určité hustoty sbalení, anebo mohou mít aktivnější funkční roli jako zprostředkovatelé proteinového rozpoznávání DNA. Tzv. krystalové vody vyskytující se ve strukturách komplexů proteinů s DNA můžeme rozdělit do čtyř tříd, jak je uvedeno v tabulce 2.1 (Reddy, 2001).

**Tabulka 2.1** Klasifikace molekul vody přítomných v krystalových strukturách komplexů proteinů s DNA (Reddy, 2001).

<b><i>Třída I</i></b>	<b><i>Molekuly vody vázané vodíkovou vazbou na protein i DNA zároveň</i></b>
Kategorie 1	protein akceptor—voda—DNA akceptor
Kategorie 2	protein akceptor—voda—DNA donor
Kategorie 3	protein donor—voda—DNA akceptor
Kategorie 4	protein donor—voda—DNA donor
<b><i>Třída II</i></b>	<b><i>Molekuly vody vázané vodíkovou vazbou buď na protein, nebo na DNA</i></b>
Kategorie 1	protein akceptor—voda
Kategorie 2	protein donor—voda
Kategorie 3	DNA akceptor—voda
Kategorie 4	DNA donor—voda
<b><i>Třída III</i></b>	<b><i>Molekuly vody orientovány proximálně k hydrofobním atomům proteinu nebo DNA</i></b>
Kategorie 1	hydrofobní atom proteinu—voda
Kategorie 2	hydrofobní atom DNA—voda
<b><i>Třída IV</i></b>	<b><i>Molekuly vody vázané vodíkovou vazbou na další molekuly vody</i></b>

Základem pro teorii vodou zprostředkovaných interakcí proteinů s DNA jsou molekuly vody spadající do třídy I, tedy molekuly vody vázané vodíkovou vazbou na

protein i DNA zároveň. Zajímavé je, že jejich zastoupení mezi ostatními třídami molekul krystalové vody v komplexech proteinů s DNA, je velmi malé, pouze 5,5 %. Úloha těchto molekul vody je redukovat elektrostatické repulse mezi dvěma akceptorovými nebo dvěma donorovými atomy. Molekuly vody spadající do kategorií 2 a 4 třídy I jsou, vzhledem k nízkému počtu donorových atomů DNA dostupných pro vodíkovou vazbu, vzácné. Ovšem molekuly vody kategorie 3 třídy I mohou být považovány za zprostředkovatele interakce vodíkovými vazbami v případech, kdy parametry sbalení komplexu neumožňují přímý kontakt mezi proteinem a DNA. Avšak četnost jejich výskytu v celkové krystalové vodě je velmi nízká (1,8 %) (Reddy, 2001).

Většina molekul krystalové vody (76 %) patří do třídy II, což naznačuje, že hlavní úlohou vody je solvatovat atomy proteinů a DNA na jejich rozhraní, spíše než zprostředkovávat interakci vodíkovými vazbami. Nejméně zastoupena je třída III, tedy molekuly vody orientovány proximálně k hydrofobním atomům proteinu nebo DNA. Na druhou stranu jejich nepřítomnost v krystalových studiích může být způsobena jejich vyšší pohyblivostí nebo neuspořádaností a tedy znesnadněním jejich pozorování rentgenovou krystalografií. Molekuly vody náležící do třídy IV se přímo neúčastní proteinového rozpoznávání DNA. Mohou být důležité, avšak spíše na vyšší úrovni organizace jako jsou klastry nebo uspořádané sítě obklopující biomolekuly (Reddy, 2001).

Trend zastoupení molekul krystalové vody v jednotlivých třídách je  $II \gg IV \gg I > III$ . Přibližně 92 % všech molekul vody přítomných v komplexech proteinů s DNA spadá do tříd II a IV a nemá tedy žádnou přímou roli při zprostředkovávání kontaktů mezi proteiny a DNA (Reddy, 2001).

## 2.4.1 Interakce FOXO proteinů s DNA

Všechny forkhead transkripční faktory rozpoznávají stejný hlavní vazebný motiv 5'-(A/C)AA(C/T)A-3' v sekvenci DNA (Overdier *et al.*, 1994). Různé podskupiny forkhead proteinů rozpoznávají rozdílné DNA sekvence lišící se bázemi v těsném okolí hlavního vazebného motivu. Proteiny z FOXO podskupiny forkhead transkripčních faktorů se váží jako monomery skrze svou DBD na DNA sekvenci 5'-GTAAACAA-3'. Tato sekvence je známá jako DBE<sup>5</sup> motiv (Furuyama *et al.*, 2000). FOXO proteiny rozpoznávají

---

<sup>5</sup> DBE je vazebný element členů rodiny DAF-16 (z angl. DAF-16 family member-binding element).

také sekvenci zvanou IRE<sup>6</sup> motiv přítomnou v oblasti promotoru IGFBP1<sup>7</sup> (Kops *et al.*, 1999). Sekvence IRE je určena jako 5'-(C/A)(A/C)AAA(C/T)AA-3' (O'Brien a Granner, 1996) a od sekvence DBE se liší svými prvními dvěma bázemi. FOXO faktory mohou vázat oba tyto motivy – DBE i IRE – ovšem sekvenci DBE váží s větší afinitou (Furuyama *et al.*, 2000).

Vazbu mezi DNA a forkhead doménou zajišťuje především helix H3 obsahující nejvíce konzervovanou aminokyselinovou sekvenci. Helix H3 se váže do velkého žlábků DNA téměř kolmo k ose DNA a vytváří silné vazby s hlavní vazebnou sekvencí DNA. Nejvíce konzervované aminokyseliny uvnitř helixu H3, shodné u všech forkhead transkripčních faktorů, a stěžejní pro vytvoření komplexu forkhead domény s DNA, jsou N148 a H152 (číslováno dle FOXO4). Kontakty mezi forkhead doménou a DNA jsou zajištěny přímými vodíkovými můstky mezi postranními řetězci aminokyselin proteinu a bázemi DNA, tzv. vodními můstky (kontakty skrze molekuly vody prostřednictvím vodíkových vazeb) a také van der Waalsovými interakcemi, a to jak mezi postranními řetězci aminokyselin proteinu a bázemi DNA, tak i postranními řetězci aminokyselin proteinu a fosfátovými zbytky cukr-fosfátové kostry DNA (Clark *et al.*, 1993).

Další oblasti forkhead domény, které se významně podílejí na tvorbě komplexu s DNA, jsou oba flexibilní ohyby W1 a W2 doprovázející helix H3. Především segment W2, tvořící specifické i nespecifické interakce s velkým i malým žlábkem DNA, je důležitou součástí DNA-vazebného povrchu. Vazba forkhead domény také způsobuje poměrně velký ohyb DNA, který vede k zúžení velkého žlábků, ve kterém je zanořen helix H3 (Clark *et al.*, 1993).

Doposud není znám přesný molekulární mechanismus rozpoznávání DNA forkhead transkripčními faktory a specifičnosti jejich vazby. Vysoce konzervovaný helix H3 je hlavním DNA rozpoznávacím místem interagujícím s hlavním vazebným motivem uvnitř velkého žlábků DNA, zatímco variabilnější oblasti jako N-terminální sekvence předcházející helix H1, oblast mezi helixy H2 a H3, ohyb W1 a C-terminální segment zajišťují jemné ladění DNA-vazebné specifičnosti a také stability komplexu forkhead domény s DNA (Obšil a Obšilová, 2008).

---

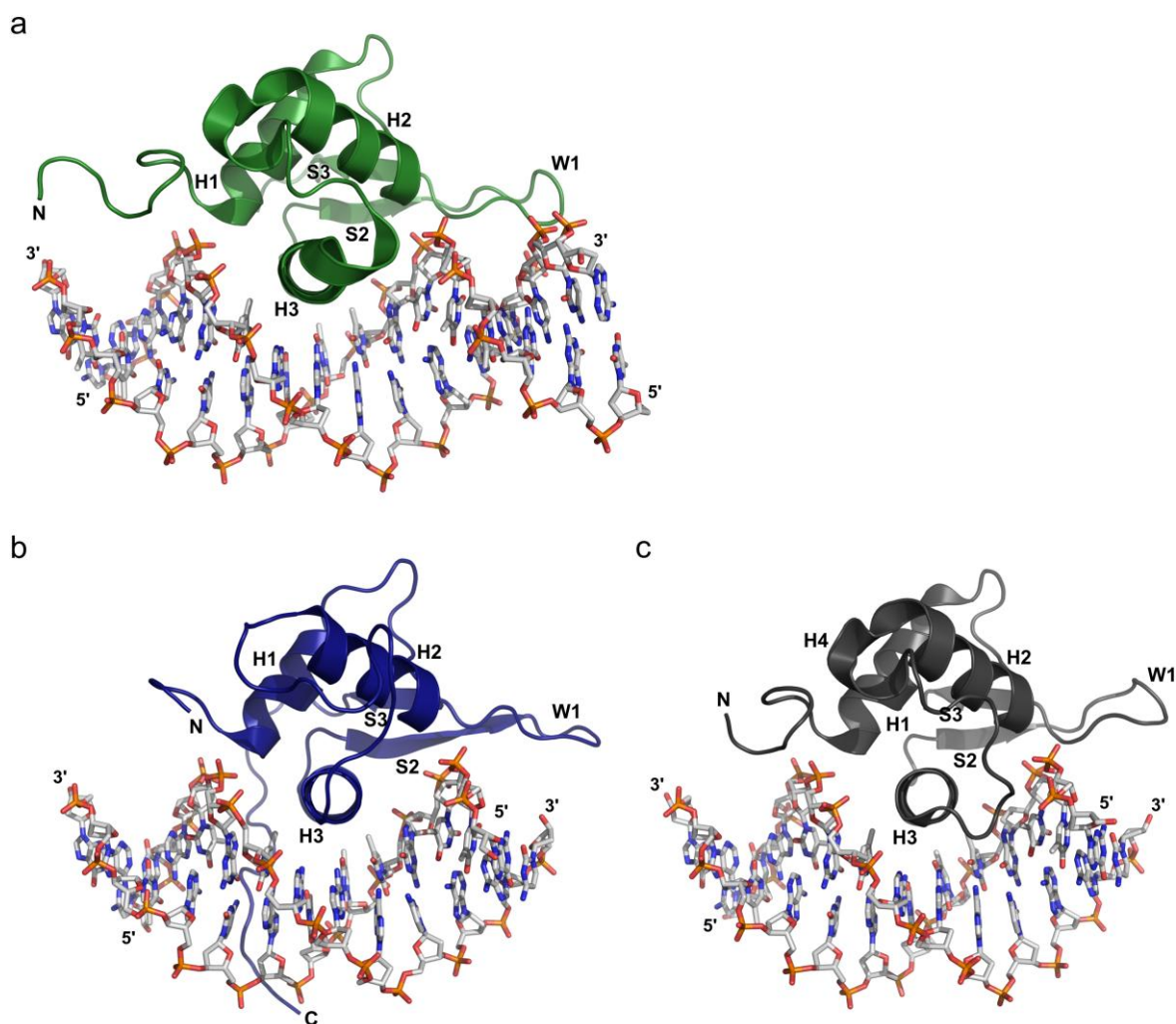
<sup>6</sup> IRE je element citlivý na insulin (z angl. insulin-responsive element).

<sup>7</sup> IGFBP1 je insulinu podobný růstový faktor vázající protein 1 (z angl. insulin-like growth factor-binding protein 1).

Rozdílné forkhead proteiny náležící do různých podskupin se skládají do téměř identického tvaru a pouhé kolísání topologického uspořádání DBD nemůže vysvětlit jejich zřetelnou DNA-vazebnou specifičnost. Je tedy pravděpodobné, že tuto specifičnost způsobují jiné vlastnosti forkhead proteinů, např. rozdíly v distribuci náboje na DNA-vazebném povrchu (Weigelt *et al.*, 2001).

Nejasná je také úloha segmentu W2 při interakci FOXO s DNA. Tato část forkhead domény je velmi flexibilní a v krystalových strukturách není vždy přítomna. Ovšem funkčními studii bylo potvrzeno, že segment W2 je důležitý pro tvorbu komplexu FOXO s DNA. A vzhledem k tomu, že W2 interaguje s oblastí DNA na 5' konci hlavního vazebného motivu, kde je několik A-T párů, je možné se domnívat, že vyšší flexibilita této části DNA, přímo související s množstvím A-T párů v sekvenci, usnadňuje interakci se segmentem W2 (Clark *et al.*, 1993; Tsai *et al.*, 2007; Brent *et al.*, 2008).

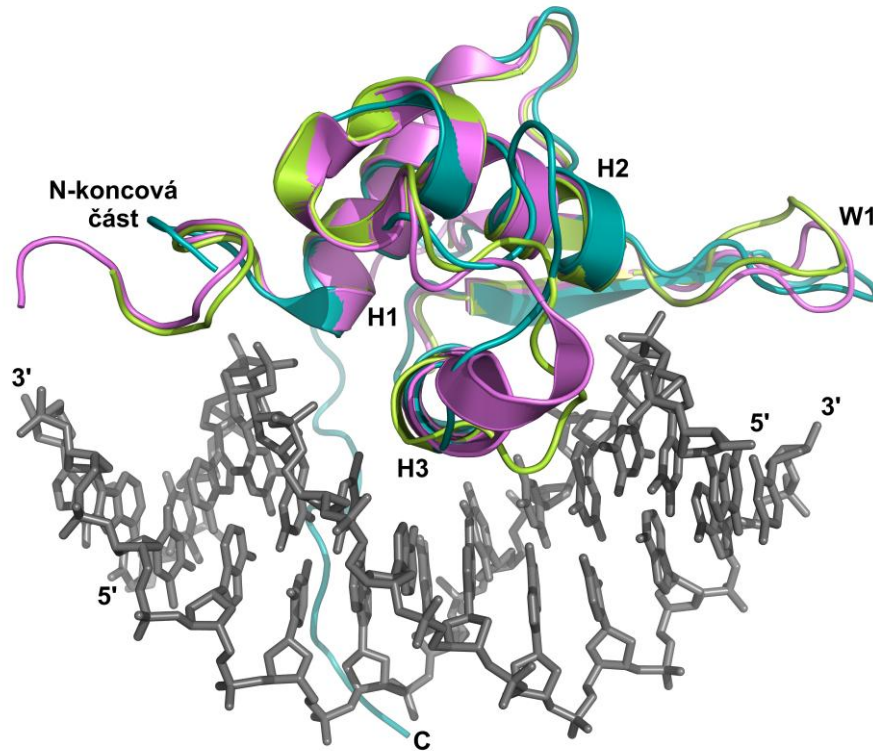
Dosud byly vyřešeny krystalové struktury DBD tří členů FOXO transkripčních faktorů v komplexu s DNA. Jsou to komplexy FOXO1-DBD:DNA (Brent *et al.*, 2008), FOXO3-DBD:DNA (Tsai *et al.*, 2007) a FOXO4-DBD:DNA (Boura *et al.*, 2010). Struktury těchto tří komplexů jsou uvedeny na obr. 2.7.



**Obr. 2.7** Krystalové struktury komplexů DNA-vazebné domény (DBD) FOXO proteinů s DNA. (a) Struktura FOXO1-DBD:DNA (Brent *et al.*, 2008). (b) Struktura FOXO3-DBD:DNA (Tsai *et al.*, 2007). (c) Struktura FOXO4-DBD:DNA (Boura *et al.*, 2010). Pro zobrazení FOXO-DBD byla použita stuhová reprezentace. Tento obrázek byl vytvořen pomocí programu PyMOL verze 0.99rc6 (<http://www.pymol.org>).

Všechny tři dostupné krystalové struktury komplexů FOXO proteinů s DNA potvrdily předpokládaný forkhead (nebo také „winged-helix“) DNA-vazebný motiv. Helix H3 (hlavní DNA-rozpoznávající oblast) ve všech těchto strukturách zapadá do velkého žlábků DNA přibližně kolmo k ose DNA (Boura *et al.*, 2010; Brent *et al.*, 2008; Tsai *et al.*, 2007).

Na obr. 2.8 je superimpozice krystalových struktur komplexů proteinů FOXO1-DBD, FOXO3-DBD a FOXO4-DBD s DNA.



**Obr. 2.8** Suprimpozice krystalových struktur komplexů DNA-vazebné domény (DBD) FOXO proteinů s DNA. Protein FOXO1-DBD (Brent *et al.*, 2008) je zachycen fialovou barvou, protein FOXO3-DBD (Tsai *et al.*, 2007) modrozelenou barvou a FOXO4-DBD (Boura *et al.*, 2010) žlutozelenou barvou. Pro větší přehlednost je zobrazena pouze DNA z komplexu FOXO4-DBD:DNA. Pro zobrazení FOXO-DBD byla použita stuhová reprezentace. Tento obrázek byl vytvořen pomocí programu PyMOL verze 0.99rc6 (<http://www.pymol.org>).

## 2.4.2 Interakce proteinu FOXO4 s DNA

Protein FOXO4-DBD (sekvence 82–183) v komplexu s DNA obsahující DBE vazebný motiv zaujímá forkhead strukturní motiv a skládá se ze tří  $\alpha$ -helixů (H1, H2 a H3) a čtvrtého krátkého  $3_{10}$ -helixu (H4) umístěného mezi helixy H2 a H3 a krátkého stočeného třívláknového antiparalelního  $\beta$ -listu sestávajícího z  $\beta$ -vláken S2 a S3 a aminokyselinových zbytků L118 a T119 působících jako třetí  $\beta$ -vlákno S1. Helix H3 se váže do velkého žlábků DNA a jeho osa leží téměř kolmo k ose DNA. Další části FOXO4-DBD, které také interagují s DNA, zahrnují flexibilní ohyb W1, otočku mezi helixy H4 a H3 a N-koncový segment; tyto části jsou uvnitř skupiny forkhead proteinů sekvenčně nejvíce variabilní a

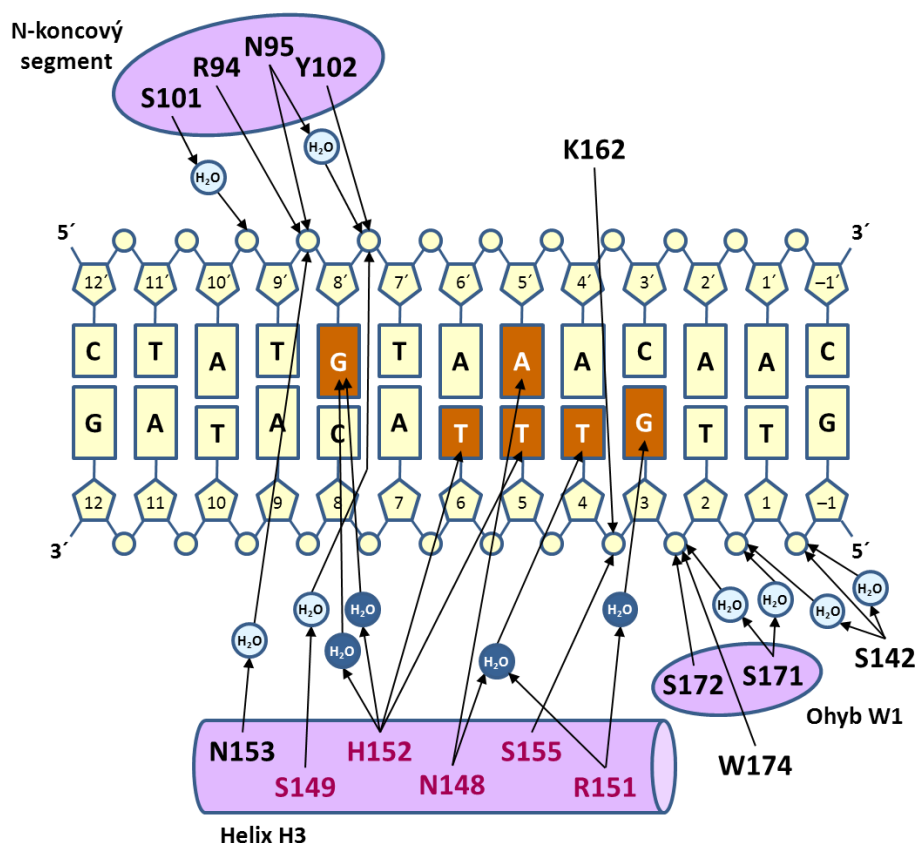
pravděpodobně hrají roli v DNA-vazebné specifičnosti jednotlivých forkhead transkripčních faktorů (Boura *et al.*, 2010).

Konzervovaný motiv helixu H3 (N148–X–X–R–H–X–X–S/T), který je přítomný u všech forkhead transkripčních faktorů, vytváří mnoho kontaktů s bázemi hlavního vazebného motivu a to skrze přímé i vodou zprostředkované vodíkové vazby, jakožto i van der Waalsovy vazby. Aminokyselinové zbytky N148 a H152 zajišťují veškeré přímé specifické kontakty na báze DNA (Boura *et al.*, 2010).

Ohyb W1 neinteraguje s bázemi DNA, vytváří pouze nespecifické kontakty s cukr-fosfátovou kostrou DNA. To naznačuje, že tato oblast DNA-vazebné domény nemá významnou roli při rozpoznávání DNA, ale spíše stabilizuje FOXO-DBD:DNA komplex. Také aminokyselinové zbytky N-koncového segmentu DBD FOXO4 tvoří přímé a vodou zprostředkované vodíkové vazby s fosfátovými skupinami DNA (Boura *et al.*, 2010).

Všechny FOXO proteiny ve srovnání s ostatními forkhead proteiny obsahují mezi helixy H2 a H3 navíc pět aminokyselin (K–G–D–S–N). Funkce těchto aminokyselin není známá a v komplexech FOXO1-DBD:DNA a FOXO3-DBD:DNA nevytváří tyto aminokyselinové zbytky žádné kontakty s DNA (Brent *et al.*, 2008; Tsai *et al.*, 2007). Avšak struktura komplexu FOXO4-DBD:DNA naznačila, že se tato oblast forkhead domény také účastní stabilizace komplexu zaujmutím odlišné konformace uvnitř velkého žlábků DNA. Amidový atom dusíku a postranní řetězec S142, jedné z vložených aminokyselin, interagují s fosfátovými skupinami kostry DNA skrze přímou vodíkovou vazbu i dvě vodou zprostředkované vodíkové vazby (Boura *et al.*, 2010).

Veškeré vazebné kontakty mezi FOXO4-DBD a DNA jsou schematicky znázorněné na obr. 2.9.



**Obr. 2.9** Schématický diagram vazebných kontaktů mezi DNA-vazebnou doménou (DBD) proteinu FOXO4 a DNA (Boura *et al.*, 2010). Aminokyselinové zbytky proteinu a báze DNA podílející se na specifické vazbě jsou označeny červeně, respektive hnědě. Polární interakce jsou znázorněny šipkami. Molekuly vody zapojené ve specifických kontaktech mezi FOXO4-DBD a DNA jsou vyznačeny jako tmavomodrá kolečka.

Krystalová struktura komplexu FOXO4-DBD:DNA ukázala mnoho uspořádaných molekul vody na vazebném rozhraní proteinu a DNA a je pravděpodobné, že tato unikátní síť vodou zprostředkovaných interakcí se významně podílí na vazbě FOXO4-DBD na DNA. Čtyři molekuly vody jsou součástí interakcí typu postranní řetězec proteinu–voda–báze DNA a devět molekul vody se podílí na interakcích typu postranní řetězec proteinu–voda–fosfátová skupina DNA. Lze předpokládat, že kromě přímých kontaktů FOXO4-DBD na báze DNA, významně přispívá ke vzniku a stabilitě komplexu FOXO4-DBD:DNA i unikátní síť vodou zprostředkovaných interakcí (Boura *et al.*, 2010).

### 3 CÍLE PRÁCE

- Studium úlohy segmentu W2 v DBD proteinu FOXO4 na stabilitě komplexu FOXO4-DBD s DNA.
  - Exprese a purifikace proteinu FOXO4-DBD (sekvence 82–207) přirozeného typu (WT).
  - Srovnání vazebné afinity DBD transkripčního faktoru FOXO4 k různým dsDNA lišícím se v sekvenci předcházející hlavní vazebný motiv využitím metod:
    - nativní elektroforéza
    - stacionární anizotropie fluorescence.
  
- Studium významu nescifických slabých interakcí (zejména vodných můstků) pro stabilitu komplexu FOXO4-DBD s DNA.
  - Příprava vektorů nesoucích vybrané mutantní formy genu pro protein FOXO4-DBD (sekvence 82–207).
  - Exprese a purifikace mutantních proteinů FOXO4-DBD.
  - Porovnání DNA-vazebné afinity proteinů FOXO4-DBD nesoucích vybrané bodové mutace pomocí metod:
    - rezonance povrchového plasmonu
    - stacionární anizotropie fluorescence.

## 4 MATERIÁLY A METODY

### 4.1 Použitý materiál

V této kapitole jsou uvedeny veškeré použité chemikálie, přístroje a ostatní materiál, které byly použity pro experimenty provedené v rámci této diplomové práce.

#### 4.1.1 Chemikálie

1,4-dithiotreitol (DTT)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Německo)
2-thioethanol ( $\beta$ ME)	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
agaróza	Carl Roth GmbH + Co. KG (Německo)
ampicilin	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
azid sodný ( $\text{NaN}_3$ )	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
bromfenolová modř	Carl Roth GmbH + Co. KG (Německo)
Coomassie Brilliant Blue R 250	LKB Bromma (Švédsko)
dekahydrát uhličitanu sodného ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ )	Lachema, s.r.o. (Česká republika)
dihydrát ethylendiamintetraoctanu disodného ( $\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	Carl Roth GmbH + Co. KG (Německo)
dihydrogenfosforečnan draselný ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	PENTA – Ing. Petr Švec (Česká republika)
dodecylsírán sodný (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Německo)
dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	PENTA – Ing. Petr Švec (Česká republika)
dusičnan stříbrný ( $\text{AgNO}_3$ )	Kovohutě Vestec (Česká republika)
ethanol	PENTA – Ing. Petr Švec (Česká republika)
fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Německo)
formaldehyd	LACH-NER, s.r.o. (Česká republika)
Gel red Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, Inc. (USA)

glycerol	PENTA – Ing. Petr Švec (Česká republika)
glycin	PENTA – Ing. Petr Švec (Česká republika)
hydroxid sodný (NaOH)	LACH-NER, s.r.o. (Česká republika)
chlorid draselný (KCl)	PENTA – Ing. Petr Švec (Česká republika)
chlorid hořečnatý (MgCl <sub>2</sub> )	LACH-NER, s.r.o. (Česká republika)
chlorid sodný (NaCl)	PENTA – Ing. Petr Švec (Česká republika)
imidazol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Německo)
isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	EMD Biosciences, Inc. (Německo)
kyselina boritá (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	LACH-NER, s.r.o. (Česká republika)
kyselina citronová monohydrát	PENTA – Ing. Petr Švec (Česká republika)
kyselina dusičná (HNO <sub>3</sub> )	PENTA – Ing. Petr Švec (Česká republika)
kyselina chlorovodíková (HCl)	PENTA – Ing. Petr Švec (Česká republika)
kyselina octová (CH <sub>3</sub> COOH)	PENTA – Ing. Petr Švec (Česká republika)
Luria-Bertani (LB) agar	Carl Roth GmbH + Co. KG (Německo)
Luria-Bertani (LB) médium	Carl Roth GmbH + Co. KG (Německo)
lysozym	SERVA Electrophoresis GmbH (Německo)
methanol	PENTA – Ing. Petr Švec (Česká republika)
N,N,N',N'-tetraethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Německo)
oligonukleotidy	VBC-Biotech Service GmbH (Rakousko)
peroxodisíran amonný (APS)	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
<i>PfuUltra</i> High-Fidelity DNA Polymerase	Stratagene Corporation (USA)
Precision Plus Protein Dual Color Standard	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)
pufř pro <i>PfuUltra</i> High-Fidelity DNA Polymerasu	Stratagene Corporation (USA)
restrikční enzym DpnI	New England BioLabs Inc. (USA)
Rotiphorese Gel 30 (směs akrylamidu a bisakrylamidu v poměru 37,5 : 1)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Německo)
SIGMAFAST Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA-Free	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
hexahydrát síranu nikelnatého (NiSO <sub>4</sub> · 6H <sub>2</sub> O)	PENTA – Ing. Petr Švec (Česká republika)
směs DNA o různých délkách	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
směs nukleotidtrifosfátů	Life Technologies Corporation (USA)

thiosíran sodný (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	LACH-NER, s.r.o. (Česká republika)
tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Německo)
Tween-20	Carl Roth GmbH + Co. KG (Německo)
vzorkový pufr pro DNA	Sigma-Aldrich Corporation (USA)

## 4.1.2 Přístroje

3505 pH Meter	Nova Capital Ltd. (Velká Británie)
ÅKTAprime	GE Healthcare (USA)
centrifuga Universal 4 x 100 • Z 323 K	HERMLE Labortechnik GmbH (Německo)
Centrifuge 5415D (rotor F45-24-11)	Eppendorf AG (Německo)
Centrifuge 5804	Eppendorf AG (Německo)
inkubátor	MELAG Medizintechnik (Německo)
Mastercycler personal	Eppendorf AG (Německo)
NanoDrop ND 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Inc. (USA)
peristaltická pumpa	IDEX Health & Science SA (Švýcarsko)
Photon Counting Spectrofluorimetr PC1	ISS, Inc. (USA)
ProteOn XPR36 Protein Interaction Array System	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)
Shaking incubator NB-205	N-BIOTEK, Inc. (Korejská republika)
Sigma 8K Floorstanding Refrigerated Centrifuge	SIGMA Laborzentrifugen GmbH (Německo)
Sonicator 3000	Misonix, Inc. (USA)
spektrofotometr Agilent 8453	Agilent Technologies, Inc. (USA)
suchý ohřívač	Grant Instruments (Velká Británie)
třepačka Multitron	Infors AG (Švýcarsko)
vodní lázeň	Memmert GmbH + Co. KG (Německo)
vortex ZX3	VELP Scientifica (Itálie)
zdroj pro horizontální elektroforézu	RNDr. Ivo Křivánek - Omni Bio (Česká republika)
zdroj pro vertikální elektroforézu	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)

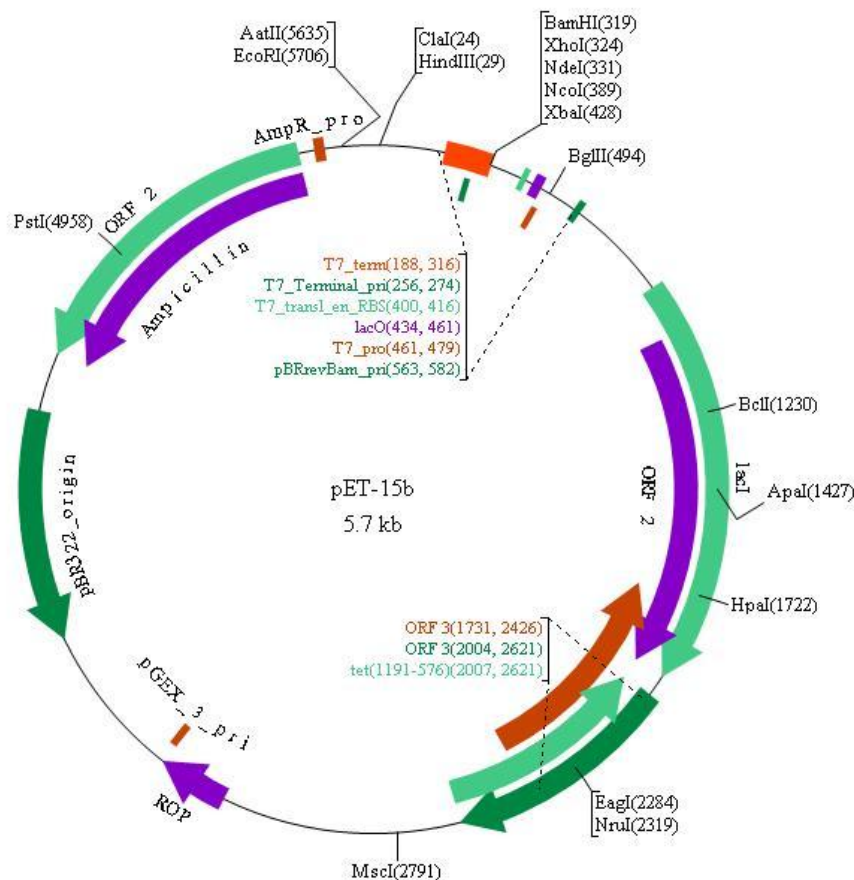
### 4.1.3 Ostatní

automatické pipety	Eppendorf AG (Německo)
dialyzační membrána (typ 27/32) (cut off 14000)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Německo)
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Stratagene Corporation (USA)
<i>Escherichia coli</i> DH5a	Stratagene Corporation (USA)
filtry Spartan 13/0,45 RC	GE Healthcare (USA)
High-Speed Plasmid Mini Kit	Geneaid Biotech Ltd. (Taiwan)
Chelating Sepharose Fast Flow	GE Healthcare (USA)
kolona pro kationtově výměnnou chromatografii naplněná 5 ml SP sepharosy	GE Healthcare (USA)
kolona Superdex 200 (10/300 GL)	GE Healthcare (USA)
kolonka pro niklovou chelatační chromatografii	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)
koncentrátory Amicon Ultra (cut off 10000)	EMD Millipore (USA)
křemenná kyveta	Agilent Technologies, Inc. (USA)
NLC ProteOn Sensor Chip	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)
nylonové filtry o velikosti pórů 0,45 $\mu$ m	GE Healthcare (USA)
set pro horizontální elektroforézu	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
set pro vertikální elektroforézu	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)
stříkačky	CHIRANA T. Injecta, a.s. (Slovenská republika)
vektor pET-15b	Novagen, Inc. (USA)

## 4.2 Příprava plasmidové DNA nesoucí mutacní formy genu pro protein FOXO4 82–207

Plasmid je malá kruhová molekula DNA schopná replikace. Ve vědě se plasmidy používají jako tzv. vektory genetické informace. Tyto vektory lze uzpůsobit tak, aby

buňky, které je nesou, byly rezistentní vůči určitému antibiotiku a aby exprimovaly žádaný protein. Námí používaný vektor byl pET-15b a jeho mapa je na obr. 4.1.



**Obr. 4.1** Mapa vektoru pET-15b. (BVTech Plasmid, Plasmid map of pET-15b, <http://www.biovisualtech.com/bvplasmid/pET-15b.htm>)

### 4.2.1 Vnesení mutace do sekvence plasmidové DNA

Plasmidy nesoucí mutantní formy genu pro protein FOXO4 82–207 byly připraveny metodou PCR<sup>8</sup>-mutagenese celého plasmidu. Při této metodě se používají komplementární oligonukleotidy obsahující žádanou mutaci a *Pfu* DNA polymerasa. Celé plasmidy, které nesou žádanou mutaci, jsou amplifikovány termocyklickou reakcí. *Pfu*

<sup>8</sup> PCR je polymerasová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)

DNA polymerasa je DNA polymerasa nalezená v termofilním organismu *Pyrococcus furiosus*.

Pro PCR byly připraveny směsi následujícího složení o celkovém objemu 50  $\mu$ l:

DNA templát (~40 ng/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
oligonukleotid I (25 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
oligonukleotid II (25 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
směs nukleotidtrifosfátů (1,6mM)	2,5 $\mu$ l
pufr pro <i>PfuUltra</i> High-Fidelity DNA Polymerasu (Stratagene Corporation (USA))	5 $\mu$ l
<i>PfuUltra</i> High-Fidelity DNA Polymerase (2,5 U/ $\mu$ l) (Stratagene Corporation (USA))	1 $\mu$ l
destilovaná voda	37,5 $\mu$ l

Směsi byly podrobeny termocyklické reakci pomocí přístroje Mastercycler personal (Eppendorf AG, Německo), na kterém byl nastaven následující cyklus:

krok 0 – předehřívání	105 °C
krok 1	95 °C/1 min
krok 2 – 30 $\times$ opakovat	95 °C/30 s
	57 °C /1 min
	68 °C/12 min
krok 3	68 °C/12 min

Po ukončení cyklu bylo k plasmidové DNA přidáno 1,5  $\mu$ l enzymu DpnI (20000 U/ml) (New England BioLabs Inc., USA) a směs byla inkubována 1,5 hodiny při 37 °C. DpnI je restriční enzym, který štěpí methylovanou DNA, čímž odstraní ze směsi templátovou DNA – templátová DNA byla izolovaná z bakterií, které produkují methylovanou DNA.

## 4.2.2 Horizontální agarózová elektroforéza

Velikost a množství připravené plasmidové DNA byla kontrolována horizontální agarózovou elektroforézou. K 9  $\mu$ l roztoku mutované plasmidové DNA byly přidány 2  $\mu$ l

vzorkového pufru pro DNA, takto připravené vzorky byly naneseny do jamek gelu, přičemž do první jamky bylo naneseno 6  $\mu$ l směsi DNA o různých délkách ve směsi se 2  $\mu$ l vzorkového pufru pro DNA. Elektroforéza probíhala v pufru 1 $\times$  TBE při napětí 75 V.

#### Složení 1% (w/v) agarózového gelu

látka	odměřené množství
agaróza	0,4 g
Gel red Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Inc., USA)	4 $\mu$ l
destilovaná voda	40 ml

#### Složení 10 $\times$ TBE pufru

látka	výsledná koncentrace	odměřené množství
Tris	890 mmol dm <sup>-3</sup>	107,8 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	890 mmol dm <sup>-3</sup>	55,0 g
Na <sub>2</sub> -EDTA · 2H <sub>2</sub> O	20 mmol dm <sup>-3</sup>	7,4 g
doplněno destilovanou vodou na objem 1 l		

### 4.2.3 Amplifikace zmutované plasmidové DNA

Pro amplifikaci vektoru pET-15b nesoucího gen pro příslušnou mutantní formu proteinu FOXO4 82–207 a rezistenci vůči antibiotiku ampicilinu, byl tento vektor transformován do kompetentních buněk *Escherichia coli* (*E. coli*) kmene DH5 $\alpha$ , které jsou uzpůsobené pro vysokou míru replikace plasmidové DNA. Kompetentní buňky jsou buňky schopné přijmout cizí DNA. Při transformaci dochází k narušení jejich buněčných stěn a vniknutí cizorodé plasmidové DNA dovnitř těchto buněk. Tímto způsobem dochází k tzv. horizontálnímu přenosu genetické informace.

Ke 30  $\mu$ l kompetentních buněk *E. coli* kmene DH5 $\alpha$  bylo přidáno 5  $\mu$ l plasmidové DNA a tato směs byla inkubována 20 minut na ledu. Následně proběhla inkubace ve vodní lázni zahřáté na 42  $^{\circ}$ C po dobu 1 minuty. Tím došlo k tzv. tepelnému šoku, čímž byly narušeny buněčné stěny bakterií a plasmidy mohly vnikat dovnitř buněk. Po tepelném šoku bylo k transformovaným buňkám přidáno 0,5 ml sterilního Luria-Bertani (LB) média a směs byla inkubována 45 až 60 minut v inkubátoru při 37  $^{\circ}$ C. Poté byly buňky

centrifugovány 1 minutu při 4000 otáčkách za minutu (rpm), většina LB média byla slita a ve zbytku (přibližně 50 až 100  $\mu$ l) byla resuspendována peleta obsahující buňky. Resuspendované buňky byly přeneseny na LB agarovou misku obsahující ampicilin o koncentraci 100  $\mu$ g/ml a rozetřeny. Miska byla vložena do inkubátoru (37 °C) dnem dolů, po 10 až 15 minutách byla obrácena a takto byla inkubována přes noc.

Z přes noc narostlých bakteriálních kultur byly připraveny tzv. miniprepy; do zkumavek s 5 ml sterilního LB média s přídavkem 5  $\mu$ l roztoku ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml (výsledná koncentrace 100  $\mu$ g/ml) byla přenesena jedna bakteriální kultura z LB agarové misky. Takto připravené miniprepy byly přes noc inkubovány při 37 °C a konstantním třepání 200 rpm.

#### **4.2.4 Izolace zmutované plasmidové DNA**

Plasmidová DNA byla izolována pomocí High-Speed Plasmid Mini Kitu (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) z přes noc kultivovaných buněk podle návodu výrobce. V jednotlivých krocích docházelo postupně ke sklizení buněk, resuspendaci buněk, lýzi buněk, neutralizaci, zachycení DNA na kolonce, oplachu a eluci DNA. Eluce byla provedena 30  $\mu$ l destilované vody zahřáté na 70 °C.

Získaná plasmidová DNA byla nechána osekvenovat v úseku kódující protein FOXO4 82–207, aby bylo možné zkontrolovat správně proběhlou mutagenézi. Sekvence byly provedeny v Laboratoři sekvenace DNA na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze.

### **4.3 Exprese FOXO4 82–207**

Pro přípravu proteinu FOXO4 82–207 byl zvolen expresní systém bakterie *E. coli* kmene BL21(DE3), tento kmen je uzpůsoben pro vysokou míru exprese proteinů. Do těchto kompetentních buněk byly transformovány vektory pET-15b se zaklonovaným genem pro protein FOXO4 82–207. Bakterie obsahující tento vektor jsou rezistentní vůči antibiotiku ampicilinu. K 50  $\mu$ l kompetentních buněk *E. coli* kmene BL21(DE3) byl přidán

1  $\mu\text{l}$  plasmidové DNA a dále byl postup transformace buněk stejný jako v kapitole 4.2.3 na str. 37.

### 4.3.1 Kultivace bakterií a indukce exprese

Z přes noc narostlých bakteriálních kultur *E. coli* kmene BL21(DE3) s transformovanými vektory pET-15b byly připraveny miniprepy, dle postupu uvedeného v kapitole 4.2.3 na str. 37.

Další den byly miniprepy přeneseny do 900 ml LB sterilního média (1 miniprep na 900 ml LB média), do kterého bylo přidáno 900  $\mu\text{l}$  roztoku ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml (výsledná koncentrace 100  $\mu\text{g/ml}$ ). Dále byly bakteriální kultury inkubovány opět při 37 °C a konstantním třepání 200 rpm až do optické density 0,8 až 0,9  $\text{cm}^{-1}$  při vlnové délce 600 nm; jako referentní roztok bylo použito LB médium s ampicilinem o koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$ . Takto narostlé kultury byly zchlazeny na 20 °C a bylo k nim přidáno 1,8 ml 0,5M roztoku induktoru isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosidu (IPTG) (výsledná koncentrace 1  $\text{mmol dm}^{-3}$ ), čímž byl zastaven růst bakterií a spuštěna proteosyntéza FOXO4 82–207. Bakterie byly dále inkubovány při 20 °C a konstantním třepání 200 rpm 12 až 18 hodin.

### 4.3.2 Sonikace

Bakterie, které předchozích 12 až 18 hodin vyráběly žádaný protein, byly centrifugovány 20 minut při 4 °C a 3000 rpm. Pelety byly resuspendovány v lyzačním pufru (na pelety ze tří 900ml dávek přibližně 70 ml lyzačního pufru) a zmraženy na -80 °C.

Po rozmražení byl k peletám přidán lysozym v množství 0,1 mg na 1 ml a následovala inkubace při 4 °C po dobu 20 minut. Dále bylo přidáno 0,8 ml roztoku (1 tableta byla rozpuštěna v 1 ml destilované vody) komerčně dostupného koktejlu inhibitorů proteas SIGMAFAST Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA-Free (Sigma-Aldrich Corporation, USA) a 100mM roztok fenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF) v ethanolu do výsledné koncentrace 1  $\text{mmol dm}^{-3}$ .

Buňky byly sonikovány na ledu 4 minuty čistého času (v cyklech 30 s zapnuto a 60 s vypnuto) při výkonu 57 wattů. Vlivem sonikace a přidaného lysozymu buňky popraskaly a exprimované proteiny byly uvolněny do roztoku. Směs byla následně centrifugována 45 minut při 4 °C a 13500 rpm. Poté byly proteiny obsaženy v supernatantu (cytosolární frakce) a pelety byly tvořeny fragmenty bakteriálních buněk.

#### Složení lyzačního pufru

látká	výsledná koncentrace	odměřené množství
PBS pufr	1×	10 ml 10× PBS pufru
NaCl	1 mol dm <sup>-3</sup>	5,84 g
βME	4 mmol dm <sup>-3</sup>	27,8 μl
imidazol	2 mmol dm <sup>-3</sup>	0,0136 g

doplněno destilovanou vodou na objem 100 ml

#### Složení 10× PBS pufru

látká	odměřené množství
NaCl	80 g
KCl	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	14,4 g
NaN <sub>3</sub>	0,4 g
doplněno destilovanou vodou na objem 1 l	
pH upraveno na hodnotu 7,4 pomocí 10M NaOH	

## 4.4 Purifikace FOXO4 82–207

Purifikace FOXO4 82–207 zahrnovala tři hlavní kroky – niklovou chelatační chromatografii, kationtově výměnnou chromatografii a gelovou permeační chromatografii. Množství a čistota FOXO4 82–207 a přítomnost degradačních produktů v jednotlivých frakcích byly během purifikace sledovány pomocí SDS<sup>9</sup> elektroforézy v poly(akrylamid)ovém gelu (SDS-PAGE).

<sup>9</sup> SDS je dodecylsírán sodný.

## 4.4.1 Niklová chelatační chromatografie

Niklová chelatační chromatografie je typ afinitní chromatografie umožňující purifikaci proteinů, které mají připojen motiv šesti histidinu, tzv. His-tag. Histidin se váže na nikelnaté kationy navázané na matrici kolony koordinačně-kovalentní vazbou. His-tag lze cíleně připojit k jednomu z konců purifikovaného proteinu a tento fúzní protein se poté váže na  $\text{Ni}^{2+}$  s vysokou afinitou. Protein lze následně z kolony vyvázat velkým nadbytkem imidazolu, který se rovněž koordinačně-kovalentně váže na  $\text{Ni}^{2+}$ .

Kolona určená k provádění niklové chelatační chromatografie obsahovala přibližně 5 ml Chelating Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, USA) a byla nejprve promyta přibližně 50 ml destilované vody, 50 ml 0,1M roztoku  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , znovu 50 ml destilované vody a 50 ml vazebného pufru pro niklovou chelatační chromatografii. V této fázi byly na matrici kolony (Chelating Sepharose Fast Flow) navázané  $\text{Ni}^{2+}$  a kolona byla připravena na zachycení proteinu. Na kolonu byla postupně nanášena veškerá cytosolární frakce obsahující exprimované proteiny získaná v předchozím kroku. Protein FOXO4 82–207 se skrze připojený His-tag navázal na  $\text{Ni}^{2+}$  uvnitř kolony. Poté byl proveden oplach 50 ml vazebného pufru pro niklovou chelatační chromatografii a následně 200 ml 10% (v/v) elučního pufru pro niklovou chelatační chromatografii ve vazebném pufru pro niklovou chelatační chromatografii. Protein byl eluován gravitačně 75% (v/v) elučním pufrům pro niklovou chelatační chromatografii ve vazebném pufru pro niklovou chelatační chromatografii do mikrozkušavek. Velikost frakcí byla 1 – 1,2 ml.

Kolona s Chelating Sepharose Fast Flow byla po provedení niklové chelatační chromatografie regenerována a uskladněna pro opětovné použití pod 20% (v/v) ethanolem v lednici. Regenerace bylo dosaženo promytím kolony přibližně 50 ml destilované vody, 50 ml regeneračního roztoku, znovu 50 ml destilované vody a 25 ml 20% (v/v) ethanolu.

Urychlení průtoku látek kolonou (kromě eluce) bylo dosaženo použitím peristaltické pumpy.

### Složení regeneračního roztoku

látká	výsledná koncentrace
$\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50 mmol $\text{dm}^{-3}$
NaCl	0,5 mol $\text{dm}^{-3}$

### Složení vazebného pufru pro niklovou chelatační chromatografii

látka	výsledná koncentrace	odměřené množství
PBS pufr	1×	50 ml 10× PBS pufru
NaCl	0,5 mol dm <sup>-3</sup>	14,6 g
βME	2 mmol dm <sup>-3</sup>	69,5 μl
imidazol	1 mmol dm <sup>-3</sup>	0,035 g

doplněno destilovanou vodou na objem 0,5 l

Složení PBS pufru viz strana 40.

### Složení elučního pufru pro niklovou chelatační chromatografii

látka	výsledná koncentrace	odměřené množství
PBS pufr	1×	25 ml 10× PBS pufru
NaCl	0,5 mol dm <sup>-3</sup>	7,3 g
βME	2 mmol dm <sup>-3</sup>	34,8 μl
imidazol	0,6 mol dm <sup>-3</sup>	10,2 g

doplněno destilovanou vodou na objem 0,25 l

pH upraveno na hodnotu 8,0 pomocí koncentrované HCl

Složení PBS pufru viz strana 40.

## 4.4.2 Dialýza

Dialýza je metoda, kterou lze od sebe oddělit látky o různé velikosti molekul. Slouží především k očištění proteinových roztoků od nízkomolekulárních látek. Roztokem proteinu se naplní polopropustná dialyzační membrána, která se umístí do dialyzačního pufru. Mezi roztokem uvnitř a vně membrány vznikne koncentrační gradient, jehož vlivem dochází k přecházení molekul, pro které je membrána propustná, skrz membránu až do vyrovnání koncentrace uvnitř a vně membrány. Membránu je tedy třeba zvolit tak, aby její póry měly menší velikost než je velikost purifikovaného proteinu, pak protein zůstane uvnitř dialyzační membrány a molekuly menší velikosti, které mohou přes membránu procházet, difundují ve směru koncentračního gradientu do okolního pufru.

Protein FOXO4 82–207 o relativní molekulové hmotnosti přibližně 16500 byl dialyzován přes polopropustnou membránu o velikosti pórů přibližně odpovídající velikosti proteinu s relativní molekulovou hmotností 14000, proti dialyzačnímu pufru maximálně 8 až 10 hodin. Do dialyzační membrány bylo k roztoku proteinu navíc přidáno 0,2 ml koktejlu inhibitorů proteas SIGMAFAST Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA-Free (Sigma-Aldrich Corporation, USA).

#### Složení dialyzačního pufru

látka	výsledná koncentrace	odměřené množství
kyselina citronová monohydrát	50 mmol dm <sup>-3</sup>	10,5 g
Na <sub>2</sub> -EDTA · 2H <sub>2</sub> O	2 mmol dm <sup>-3</sup>	4 ml 0,5M Na <sub>2</sub> -EDTA · 2H <sub>2</sub> O
DTT	2 mmol dm <sup>-3</sup>	0,31 g
doplněno destilovanou vodou na objem 1 l		
pH upraveno na hodnotu 6,3 pomocí koncentrované HCl		

### 4.4.3 Kationtově výměnná chromatografie

Iontově výměnná chromatografie, je metoda umožňující separaci látek na základě jejich náboje. Kationtově výměnnou chromatografií lze z roztoku odseparovat látky, které v něm existují ve formě kationu. Provádí se na koloně obsahující stacionární fázi – ionex, respektive katex, což je chemicky inertní nosič s elektrostaticky vázanými kationy. Kationy katexu lze reversibilně vyměňovat za kationy z protékajícího roztoku.

Aby bylo možné purifikovat proteiny kationtově výměnnou chromatografií, musejí být v roztoku ve formě kationů, toho lze docílit volbou pufru (jeho pH), ve kterém bude protein rozpuštěn. pH pufru musí být nastaveno na hodnotu menší než je pI proteinu.

Před provedením kationtově výměnné chromatografie byl protein rozpuštěn v dialyzačním pufru, jehož pH bylo nastaveno na hodnotu 6,3. Protein FOXO4 82–207 se při tomto pH vyskytuje ve formě kationu. Teoretická hodnota pI, vypočítaná na základě primární struktury pomocí nástroje ProtParam na <http://www.expasy.org>, je pro protein FOXO4 82–207 přirozený typ (WT) 10,53 a u námi připravovaných mutantů se pohybuje mezi hodnotami 9,85 a 10,66.

Roztok proteinu byl před provedením kationtové výměnné chromatografie přefiltrován přes filtr o velikosti pórů 0,45 µm.

Pro kationtové výměnnou chromatografii byla použita kolona obsahující 5 ml SP sepharosy (GE Healthcare, USA), která byla připojena k přístroji ÄKTAprime pro HPLC (GE Healthcare, USA). Výstupní data byla analyzována programem Unicorn 4.11. Kolona byla před nanesením vzorku ekvilibrována vazebným pufrům pro kationtové výměnnou chromatografii. Po nástřiku vzorku byla průtoková rychlost kolonou 1,5 ml/min. Po zachycení proteinu na koloně byl proveden oplach nejprve vazebným pufrům pro kationtové výměnnou chromatografii (přibližně třemi objemy kolony) a poté 20% (v/v) elučním pufrům pro kationtové výměnnou chromatografii ve vazebném pufru pro kationtové výměnnou chromatografii (přibližně osmi objemy kolony). Eluce proteinu byla provedena gradientem iontové síly, kterého bylo dosaženo gradientem obsahu elučního pufru pro kationtové výměnnou chromatografii ve vazebném pufru pro kationtové výměnnou chromatografii a to od 20% (v/v) obsahu elučního pufru pro kationtové výměnnou chromatografii ve vazebném pufru pro kationtové výměnnou chromatografii až po 100% eluční pufr pro kationtové výměnnou chromatografii. Při eluci byly frakce sbírány do mikrozkušavek po 0,5 ml.

#### **Složení vazebného pufru pro kationtovou výměnnou chromatografii**

<b>látká</b>	<b>výsledná koncentrace</b>	<b>odměřené množství</b>
kyselina citronová monohydrát	50 mmol dm <sup>-3</sup>	10,5 g
Na <sub>2</sub> -EDTA · 2H <sub>2</sub> O	1 mmol dm <sup>-3</sup>	2 ml 0,5M Na <sub>2</sub> -EDTA · 2H <sub>2</sub> O
DTT	2 mmol dm <sup>-3</sup>	0,31 g
doplněno destilovanou vodou na objem 1 l		
pH upraveno na hodnotu 6,3 pomocí 10M NaOH		

### Složení elučního pufru pro kationtovou výměnnou chromatografií

látka	výsledná koncentrace	odměřené množství
kyselina citronová monohydrát	50 mmol dm <sup>-3</sup>	10,5 g
Na <sub>2</sub> -EDTA · 2H <sub>2</sub> O	1 mmol dm <sup>-3</sup>	2 ml 0,5M Na <sub>2</sub> -EDTA · 2H <sub>2</sub> O
DTT	2 mmol dm <sup>-3</sup>	0,31 g
NaCl	1 mol dm <sup>-3</sup>	58,4 g
doplněno destilovanou vodou na objem 1 l		
pH upraveno na hodnotu 6,3 pomocí 10M NaOH		

Pufry používané pro kationtově výměnnou chromatografií byly přefiltrovány přes nylonové filtry o velikosti pórů 0,45 µm.

#### 4.4.4 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie (nebo lépe angl. size-exclusion chromatography) je metoda dělení látek na základě hydrodynamických objemů jejich molekul. K dělení látek dochází uvnitř kolony naplněné zrnitým porézním gelem a pufrem. Zrna gelu obsahují póry různých velikostí, do kterých mohou vnikat pouze molekuly nepřevyšující svou velikostí (hydrodynamickým objemem) rozměry těchto pórů. Během gelové permeační chromatografie dochází k distribuci molekul obsažených v roztoku mezi rozpouštědlo vně zrn gelu a rozpouštědlo uvnitř těchto zrn. Při správně zvolené poréznosti gelu, jsou pro některé molekuly dosažitelné všechny póry zrn gelu, pro další pouze některé póry a některé nemohou vnikat do žádných pórů a kolonou procházejí pouze prostorem mezi jednotlivými zrny gelu. Nejdéle jsou na koloně zadrženy molekuly, pro které jsou přístupné všechny póry zrn gelu, a naopak molekuly, které do pórů zrn gelu vnikat nemohou, jsou eluovány nejdříve. Takto jsou tedy molekuly rozděleny podle svého hydrodynamického objemu, největší molekuly obsažené v roztoku procházejí kolonou v nejkratším retenčním čase a nejmenší molekuly naopak v nejdelším retenčním čase.

Roztok proteinu byl před provedením gelové permeační chromatografie zakonzentrován na objem menší než 2 ml a přefiltrován přes filtr o velikosti pórů 0,45 µm.

Purifikace proteinu metodou gelové permeační chromatografie byla provedena pomocí přístroje ÄKTAprime pro HPLC (GE Healthcare, USA) s připojenou kolonou Superdex 200 (10/300 GL) (GE Healthcare, USA). Kolona byla před nástřikem vzorku ekvilibrována pufr pro gelovou permeační chromatografii a po nástřiku vzorku byla průtoková rychlost nastavena na 0,4 ml/min. Výstupní data byla analyzována programem Unicorn 4.11. Při eluci byly frakce sbírány do mikrozkušavek po 0,5 ml.

#### Složení pufru pro gelovou permeační chromatografii

látká	výsledná koncentrace	odměřené množství
Tris/HCl, pH 7,5	20 mmol dm <sup>-3</sup>	20 ml 1M Tris/HCl, pH 7,5
NaCl	100 mmol dm <sup>-3</sup>	5,84 g
Na <sub>2</sub> -EDTA · 2H <sub>2</sub> O	1 mmol dm <sup>-3</sup>	2 ml 0,5M Na <sub>2</sub> -EDTA · 2H <sub>2</sub> O
DTT	2 mmol dm <sup>-3</sup>	0,31 g
glycerol	10 % (w/v)	100 g
doplněno destilovanou vodou na objem 1 l		

Pufr pro gelovou permeační chromatografii byl přefiltrován přes nylonový filtr o velikosti pórů 0,45 µm.

#### 4.4.5 SDS-PAGE

Při elektroforetických metodách dochází k dělení látek v elektrickém poli. Nabitě částice se vlivem elektrického pole pohybují k opačnému pólu rychlostí, která je přímo úměrná velikosti jejich náboje a nepřímo úměrná velikosti těchto částic. SDS-PAGE je elektroforéza prováděná v poly(akrylamid)ovém gelu (PAGE) a v denaturujícím prostředí silného detergentu dodecylsírany sodného (SDS). SDS je povrchově aktivní látka, která se váže na proteiny, denaturuje je a přiděluje jim záporný náboj, který překryje jejich přirozený náboj. Velikost tohoto přiděleného náboje je přímo úměrná velikosti proteinu. Za takovýchto podmínek mají všechny proteiny stejnou elektroforetickou pohyblivost. Pokud SDS elektroforézu provádíme v gelu, dochází navíc k dělení látek gelovou filtrací, tzn. na základě hydrodynamického objemu částic. Vlákniatá struktura poly(akrylamidu)

způsobuje, že větší částice zaostávají za menšími, protože se setkávají s větším odporem při průchodu gelem. Výsledkem tedy je, že SDS-PAGE dělí proteiny podle velikosti molekul a elektrické pole zde působí pouze jako hnací síla pohybu částic.

SDS-PAGE byla prováděna po jednotlivých purifikačních krocích pro ověření přítomnosti proteinu, zjištění jeho průběžné čistoty a zjištění eventuelní přítomnosti degradačních produktů. Na základě SDS-PAGE byly vždy vybrány nejlepší frakce, které byly buď sloučeny a dále purifikovány, nebo byly použity pro experimenty.

SDS-PAGE probíhala za konstantního napětí 200 V. Byl použit 15% separační a 5% zaváděcí poly(akrylamid)ový gel.

### **Příprava vzorků**

Z každé frakce předešlého purifikačního kroku byl do mikrozkušavky odebrán 5  $\mu$ l vzorek obsahující protein, dále bylo přidáno 5  $\mu$ l SDS vzorkového pufru a 10  $\mu$ l destilované vody (celkový objem 20  $\mu$ l). Takto připravené vzorky byly inkubovány 1 minutu při teplotě 100 °C, čímž byla zajištěna denaturace proteinů.

Do první jamky byl pokaždé nanesen standard molekulových hmotností Precision Plus Protein Dual Color Standard (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) obsahující směs fragmentů o relativních molekulových hmotnostech 250  $\cdot$  10<sup>3</sup>, 150  $\cdot$  10<sup>3</sup>, 100  $\cdot$  10<sup>3</sup>, 75  $\cdot$  10<sup>3</sup>, 50  $\cdot$  10<sup>3</sup>, 37  $\cdot$  10<sup>3</sup>, 25  $\cdot$  10<sup>3</sup>, 20  $\cdot$  10<sup>3</sup>, 15  $\cdot$  10<sup>3</sup> a 10  $\cdot$  10<sup>3</sup>.

### **Složení SDS vzorkového pufru**

<b>látka</b>	<b>odměřené množství</b>
Tris/HCl, pH 6,8	0,6 ml 1M Tris/HCl, pH 6,8
glycerol	5 ml 50% (w/v) glycerol
SDS	2 ml 10% (w/v) SDS
$\beta$ ME	0,5 ml
bromfenolová modř	1 ml 1% (w/v) bromfenolové modři
destilovaná voda	0,9 ml

### Složení separačního gelu

látka	odměřené množství
Rotiphorese Gel 30	6,000 ml
pufr pro separační gel	3,000 ml
destilovaná voda	2,880 ml
APS	0,100 ml 10% (w/v) APS
TEMED	0,012 ml

### Složení pufru pro separační gel

látka	odměřené množství
Tris/HCl, pH 8,8	75 ml 1,5M Tris/HCl, pH 8,8
SDS	4 ml 10% (w/v) SDS

doplněno destilovanou vodou na objem 100 ml

### Složení zaváděcího gelu

látka	odměřené množství
Rotiphorese Gel 30	0,500 ml
pufr pro zaváděcí gel	1,000 ml
destilovaná voda	2,250 ml
APS	0,045 ml 10% (w/v) APS
TEMED	0,005 ml

### Složení pufru pro zaváděcí gel

látka	odměřené množství
Tris/HCl, pH 6,8	50 ml 1M Tris/HCl, pH 6,8
SDS	4 ml 10% (w/v) SDS

doplněno destilovanou vodou na objem 100 ml

### Složení elektroforetického pufru

látka	výsledná koncentrace
Tris/HCl, pH 8,3	50 mmol dm <sup>-3</sup>
glycin	385 mmol dm <sup>-3</sup>
SDS	0,1 % (w/v)

## Vizualizace gelů

Pro účely vizualizace gelů po SDS–PAGE bylo použito barvivo Coomassie Brilliant Blue R 250. Gely byly nejprve inkubovány po dobu 15 minut v barvicím roztoku při teplotě 70 °C, čímž došlo k navázání Coomassie Brilliant Blue R 250 na proteiny. Pro zviditelnění proteinů bylo třeba odbarvit gely, a to inkubací v odbarvovacím roztoku přes noc. Tento proces byl urychlen zahřáním roztoku k varu.

### Složení barvicího roztoku

látka	odměřené množství
Coomassie Brilliant Blue R 250	1 g
methanol	450 ml
kyselina octová	100 ml
doplněno destilovanou vodou na objem 1 l	

### Složení odbarvovacího roztoku

látka	odměřené množství
methanol	100 ml
kyselina octová	100 ml
doplněno destilovanou vodou na objem 1 l	

## 4.4.6 Určení koncentrace proteinů

Koncentrace fúzních proteinů byly určeny metodou měření absorbance při vlnové délce 280 nm. Jako referentní vzorek byl použit čistý pufr, ve kterém byly proteiny rozpuštěny. Koncentrace proteinů  $c$  byla počítána podle Lambertova-Beerova zákona

$$A = cl\varepsilon, \quad (1)$$

kde  $A$  je absorbance,  $l$  je délka optické dráhy a  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient, který byl pro jednotlivé proteiny určen na základě jejich primární struktury pomocí nástroje ProtParam na <http://www.expasy.org>.

Měření absorbance roztoků proteinů bylo provedeno na přístroji NanoDrop ND 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA).

## **4.5 Studium interakcí mezi FOXO4 82–207 a DNA**

Interakce mezi FOXO4 82–207 byly studovány metodami nativní elektroforéza, stacionární anizotropie fluorescence a rezonance povrchového plasmonu.

### **4.5.1 Příprava dvojláknové DNA (dsDNA) z oligonukleotidů**

Jednotlivé oligonukleotidy byly rozpuštěny v destilované vodě a zředěny na koncentraci  $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$ . Rozředěné komplementární oligonukleotidy byly smíchány v ekvivalentním množství. Ke  $100 \mu\text{l}$  směsi oligonukleotidů bylo přidáno  $2,5 \mu\text{l}$  1M roztoku NaCl (výsledná koncentrace  $25 \text{mmol dm}^{-3}$ ). Směsi byly zahřáty na teplotu  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  a poté byly nechány volně zchladnout při pokojové teplotě. Tento proces vedl k hybridizaci komplementárních oligonukleotidů a vzniku dsDNA. Výsledná koncentrace dsDNA v roztoku byla  $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ . DNA konstrukty značené fluoresceinem (Flc) (pro měření stacionární anizotropie fluorescence) byly chráněny před světlem.

### **4.5.2 Nativní elektroforéza**

Při nativní elektroforéze dochází k dělení látek na základě jejich elektroforetické mobility, která je přímo úměrná velikosti jejich náboje a nepřímo úměrná velikosti jejich částic. Těto metody se využívá např. pro sledování tvorby komplexů, v našem případě FOXO4 82–207 s DNA.

Série vzorků pro nativní elektroforézu byla připravena podle schématu uvedeného v tabulce 4.1.

**Tabulka 4.1** Schéma přípravy vzorků pro nativní elektroforézu.

vzorek č.	složení						
	FOXO4 82–207 (0,4mM)		DNA (0,05mM)		MgCl <sub>2</sub> (20mM)	vzorkový pufr	H <sub>2</sub> O
	n/nmol	V/μl	n/nmol	V/μl	V/μl	V/μl	V/μl
1	2,4	6	0	0	1,55	3,9	8
2	0	0	0,4	8	1,55	3,9	6
3	0,8	2	0,4	8	1,11	2,7	0
4	1,2	3	0,4	8	1,22	3,0	0
5	1,6	4	0,4	8	1,33	3,3	0
6	2,0	5	0,4	8	1,44	3,6	0
7	2,4	6	0,4	8	1,55	3,9	0

Vzorky byly inkubovány 30 minut na ledu před přidáním vzorkového pufru pro nativní elektroforézu. Hotové vzorky byly nanášeny do jamek 12% poly(akrylamid)ového gelu. Elektroforéza probíhala v pufru 1× TBE při konstantním napětí 150 V a nádoba byla ponořena do vody s ledem.

#### Složení 12% poly(akrylamid)ového gelu

látka	odměřené množství
Rotiphorese Gel 30	4,8 ml
TBE pufr	1,2 ml 10× TBE pufru
destilovaná voda	5,94 ml
APS	120 μl 10% (w/v) APS
TEMED	15 μl

Složení 10× TBE pufru viz strana 37.

#### Složení barvy pro nativní elektroforézu

látka	odměřené množství
TBE pufr	1 ml 10× TBE pufru
bromfenolová modř	10 mg
glycerol	3 ml
doplněno destilovanou vodou na objem 10 ml	

Složení 10× TBE pufru viz strana 37.

## Vizualizace gelů

Gely byly po provedení nativní elektroforézy vizualizovány metodou barvení stříbrem (angl. silver-staining). Stříbrné kationy v roztoku se naváží na záporně nabitě molekuly DNA (vyskytující se samostatně i v komplexu s proteinem) zachycené v poly(akrylamid)ovém gelu a následně jsou stříbrné kationy redukovány na kovové stříbro, které je v gelu jasně patrné.

Gely byly po ukončení elektroforézy jednotlivě inkubovány 15 minut v 75 ml 1% (v/v) roztoku  $\text{HNO}_3$ , poté byla kyselina slita a gely byly opláchnuty destilovanou vodou. Následovala inkubace v 75 ml destilované vody s přídavkem 0,5 ml 30% (w/v)  $\text{AgNO}_3$  po dobu 15 minut. Roztok byl slit a gely byly opláchnuty destilovanou vodou a rychle přeneseny do 75 ml redukčního roztoku. Gely byly za stálého míchání inkubovány v redukčním roztoku až do dostatečné vizualizace. Redukce stříbrných kationů (a tím vizualizace gelů) byla zastavena přenesením gelů do 10% kyseliny octové.

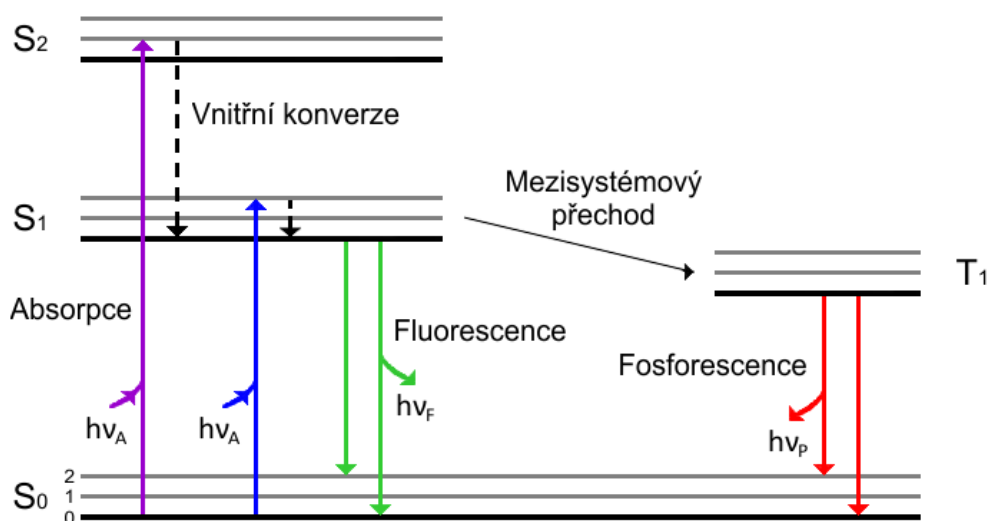
## Složení redukčního roztoku

látka	odměřené množství
$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	75 ml 3% (w/v) roztoku
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	6,6 $\mu\text{l}$ 2,25% (w/v) roztoku
formaldehyd	37,5 $\mu\text{l}$

## 4.5.3 Stacionární anizotropie fluorescence

Fluorescence je jedna ze dvou kategorií tzv. luminiscence. Luminiscence je emise světla jakoukoli látkou nacházející se v elektronicky excitovaném stavu. Druhou kategorií luminiscence je fosforescence. Rozdíl mezi fluorescencí a fosforescencí spočívá v povaze excitovaného stavu. Fluorescence je přechod elektronu z excitovaného singletového stavu do základního singletového stavu. Elektron ve vyšším orbitalu má opačný spin než druhý elektron v základním orbitalu. Tyto elektrony jsou tedy spárované a přechod elektronu do základního stavu je spinově povolený a děje se rychle emisí fotonu. Rychlost fluorescenční emise je typicky  $10^8 \text{ s}^{-1}$  a střední doba života fluoroforu v excitovaném stavu – střední čas mezi excitací a návratem do základního stavu – tedy bývá okolo 10 ns. Fosforescence je emise při přechodu elektronu z excitovaného tripletového stavu do základního singletového stavu. Tento přechod je na rozdíl od fluorescence spinově zakázaný, jelikož

elektron v excitovaném stavu má stejnou spinovou orientaci jako elektron v základním stavu. Rychlost emise při fosforescenci je proto menší ( $10^3$  až  $10^0$  s<sup>-1</sup>), střední doba života excitovaného stavu molekul je typicky v milisekundové až sekundové škále. Absorpci a emisi světla a doprovodné procesy přehledně znázorňuje Jablonského diagram, který je uveden na obr. 4.2 (Lakowicz, 2006).



**Obr. 4.2** Jablonskiho diagram (Lakowicz, 2006).

Anizotropie fluorescence je jev, při kterém je intenzita emitované fluorescence různá pod různými úhly polarizace. Pokud je excitační záření polarizované dochází k fotoselektivní excitaci molekul fluoroforu. To znamená, že excitovány jsou pouze ty molekuly fluoroforu, jejichž dipólový moment je v okamžiku dopadu excitačního záření orientovaný paralelně k rovině polarizovaného excitačního záření. A jestliže je excitační záření polarizované, bude i emisní záření polarizované. Míru polarizace tohoto emisního záření (fluorescence) vyjadřuje veličina anizotropie fluorescence  $r$ , která je definována vztahem

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}, \quad (2)$$

kde  $I_{\parallel}$  je intenzita emisního záření orientovaného paralelně k rovině polarizace excitačního záření a  $I_{\perp}$  je intenzita emisního záření orientovaného kolmo k rovině

polarizace excitačního záření. Pro počáteční anizotropii fluorescence daného fluoroforu  $r_0$  platí vztah

$$r_0 = \frac{2}{5} \left( \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right), \quad (3)$$

ze kterého vyplývá, že hodnota počáteční anizotropie fluorescence daného fluoroforu může nabývat maximálně hodnoty 0,4. Faktor  $\frac{2}{5}$  vyjadřuje snížení anizotropie vlivem fotoselekce a  $\beta$  je úhel, který svírají absorpční a emisní transitní dipólový moment molekuly fluoroforu. Maximální hodnota počáteční anizotropie fluorescence může být pozorována pouze v absolutní nepřítomnosti depolarizujících efektů. Hodnota anizotropie fluorescence může být snížena různými jevy, jako je rotační difúze molekul nebo přenos energie. Rotační difúze molekul je ovlivněna velikostí a tvarem molekul a během doby života excitovaného stavu způsobuje změnu orientace dipólů fluoreskujících molekul (Lakowicz, 2006).

Měření anizotropie fluorescence má široké biochemické využití, umožňuje např. studium asociačních rovnováh biomolekul, tekutosti biomembrán nebo denaturace proteinů (Lakowicz, 2006).

V této práci bylo měření anizotropie fluorescence použito ke studiu DNA-vazebné afinity proteinu FOXO4 82–207. Jelikož DNA ani FOXO4 82–207 nejsou fluoreskující molekuly, byla pro toto měření použita DNA označená na 5' konci jednoho vlákna fluoresceinem. Postup přípravy dsDNA z oligonukleotidů je uveden v kapitole 4.5.1 na str. 50.

Anizotropie fluorescence byla měřena ve stacionárním módu, tedy bez možnosti měřit časově-rozlišené dohasínání anizotropie. Vztahy (2) a (3) platí i pro stacionární anizotropii fluorescence. Kyveta pro měření stacionární anizotropie fluorescence na začátku obsahovala 1 ml pufru pro měření stacionární anizotropie fluorescence a 2  $\mu$ l 50  $\mu$ M Flc-dsDNA (výsledná koncentrace 0,1  $\mu$ mol  $\text{dm}^{-3}$ ). Protein FOXO4 82–207 byl do kyvety titrován, po každém přidavku proteinu byl obsah kyvety promíchán a před měřením byla 1,5 minuty nechána ustavit rovnováha. Měření stacionární anizotropie fluorescence bylo provedeno na přístroji Photon Counting Spectrofluorimetr PC1 (ISS, Inc. (USA), excitační vlnová délka byla nastavena na hodnotu 494 nm a emisní vlnová délka na hodnotu 520 nm.

## Složení pufru pro měření stacionární anizotropie fluorescence

látka	výsledná koncentrace	odměřené množství
Tris/HCl, pH 7,5	20 mmol dm <sup>-3</sup>	800 μl 1M Tris/HCl, pH 7,5
NaCl	100 mmol dm <sup>-3</sup>	800 μl 5 M NaCl

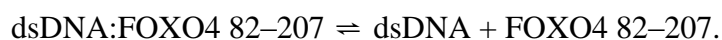
Stacionární anizotropie fluorescence ( $r$ ) byla počítána z intenzit fluorescence podle vztahu (2). Získané hodnoty anizotropie fluorescence byly přepočítány na hodnoty změny anizotropie fluorescence  $\Delta r$  podle vztahu

$$\Delta r = r_{\text{obs}} - r_{\text{min}}, \quad (4)$$

kde  $r_{\text{obs}}$  je pozorovaná anizotropie při dané koncentraci FOXO4 82–207 a  $r_{\text{min}}$  je minimální pozorovaná anizotropie při nulové koncentraci FOXO4 82–207. Hodnoty  $\Delta r$  byly poté vyneseny do grafu proti koncentraci FOXO4 82–207 ( $c_{\text{rel, FOXO4 82-207}}$ ) a získaná závislost byla proložena rovnicí

$$\Delta r = \frac{\Delta r_{\text{max}} c_{\text{rel, FOXO4 82-207}}}{K_D + c_{\text{rel, FOXO4 82-207}}}, \quad (5)$$

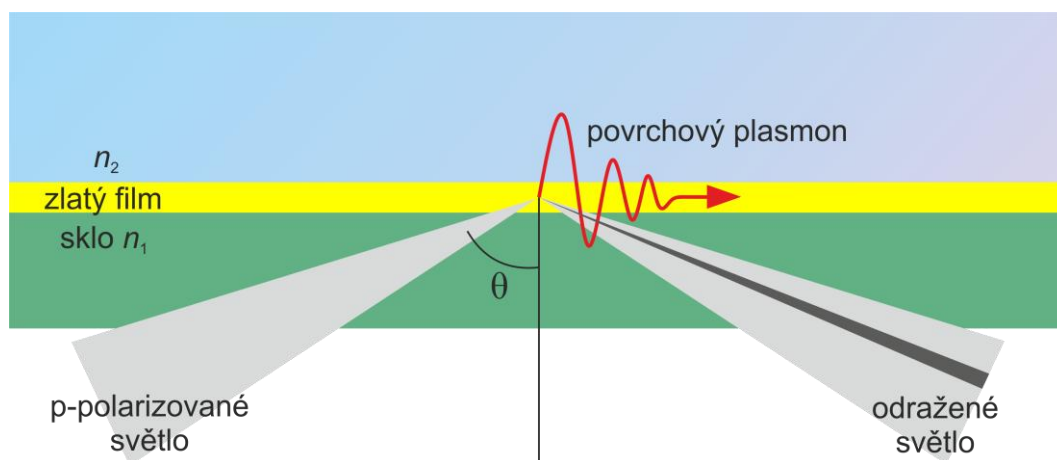
kde  $\Delta r_{\text{max}}$  je maximální pozorovaná změna anizotropie a  $K_D$  je disociační konstanta rovnováhy



### 4.5.4 Rezonance povrchového plasmonu

Rezonance povrchového plasmonu (SPR – z angl. surface plasmon resonance) je fyzikální jev, ke kterému dochází na povrchu některých kovů (používá se především zlato) při dopadu paprsku světla pod určitým úhlem. Uspořádání, při kterém dochází k rezonanci povrchového plasmonu, je ukázáno na obr. 4.3. Povrchové plasmony (nebo také povrchové plasmonové polaritony) jsou elektromagnetické vlny propagující rovnoběžně s rozhraním

kovu a dielektrika, vznikají díky oscilacím v hustotě elektronového plynu v kovovém filmu.



**Obr. 4.3** Vznik povrchové plasmonové rezonance.  $n_1 > n_2$  a  $\theta$  je větší než mezní úhel, tzn. dochází k totálnímu odrazu.  $n_1$  a  $n_2$  jsou indexy lomu a  $\theta$  je úhel dopadu.

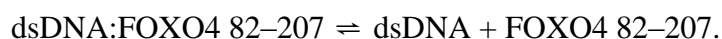
Pokud dochází na rozhraní dvou prostředí o rozdílném indexu lomu k totálnímu odrazu dopadajícího světla, část záření pronikne do prostředí o nižším indexu lomu, v důsledku čehož vzniká exponenciálně tlumená elektromagnetická vlna. S touto vlnou může rezonovat povrchový plasmon, což dává za vznik jevu SPR. Díky přenosu energie mezi tlumenou elektromagnetickou vlnou a povrchovým plasmonem se v odraženém světle objevuje stín pod určitým úhlem. Podmínky rezonance povrchového plasmonu jsou ovlivněny indexem lomu prostředí na povrchu kovového filmu a ten je závislý na hmotnostní koncentraci molekul adsorbovaných na kovovém filmu. Mezi rezonanční energií (úhlu stínu v odraženém světle) a hmotnostní koncentrací adsorbovaných molekul existuje lineární závislost. V biologických aplikacích se využívá toho, že SPR signál je velmi citlivý na index lomu prostředí v těsné blízkosti povrchu kovového filmu a je tedy možné velmi přesně sledovat adsorpci molekul na kovový povrch nebo jejich interakce s ligandem imobilizovaným na kovovém filmu.

Měření rezonance povrchového plasmonu bylo provedeno při teplotě 25 °C na čipu NLC ProteOn Sensor Chip (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) pomocí přístroje ProteOn XPR36 Protein Interaction Array System (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). Na neutravidinový čip byla navázána dsDNA s navázaným biotinem na jednom 5' konci. Příprava dsDNA z oligonukleotidů viz kapitola 4.5.1 na str. 50. dsDNA byl vázána na čip po dobu 2 minut při průtokové rychlosti 30  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Volně navázaný materiál byl z povrchu

čipu odstraněn dvěma 20 $\mu$ l nástřiky 50mM roztoku NaOH. SPR experimenty byly provedeny v TBS pufru při průtokové rychlosti 50  $\mu$ l/min (v asociační i disociační fázi senzogramu). Pro určení disociační konstanty  $K_D$  komplexu dsDNA:FOXO4 82–207 bylo použito pět různých koncentrací (200, 100, 50, 25 a 12,5  $\text{nmol dm}^{-3}$ ) jednotlivých FOXO 82–207 proteinů. Povrch čipu byl regenerován 100  $\mu$ l 2M roztoku NaCl. Ze senzogramů byly odečteny rezonanční signály v rovnováze  $R_{\text{eq}}$  pro jednotlivé koncentrace proteinů. Hodnoty  $R_{\text{eq}}$  byly poté vyneseny do grafu proti koncentraci FOXO4 82–207 ( $c_{\text{rel,FOXO4 82-207}}$ ) a získaná závislost byla proložena rovnicí

$$R_{\text{eq}} = \frac{R_{\text{eq}} c_{\text{rel,FOXO482-207}}}{K_D + c_{\text{rel,FOXO482-207}}}, \quad (6)$$

kde  $K_D$  je disociační konstanta rovnováhy



### Složení TBS pufru

látka	výsledná koncentrace
Tris/HCl, pH 7,5	20 $\text{mmol dm}^{-3}$
NaCl	150 $\text{mmol dm}^{-3}$
Na <sub>2</sub> -EDTA · 2H <sub>2</sub> O	0,1 $\text{mmol dm}^{-3}$
Tween-20	0,005 % (v/v)

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Příprava plasmidové DNA nesoucí mutacní formy genu pro protein FOXO4 82–207

Celkem bylo v naší laboratoři připraveno 16 různých vzorků plasmidových DNA nesoucích vybrané bodové mutace v genu pro protein FOXO4-DBD (sekvence 82–207). Tyto mutace uvádím v tabulce 5.1. Osobně jsem připravovala pouze některé z nich a tyto jsou v tabulce 5.1 označeny hvězdičkou a červenou výplní.

*Tabulka 5.1* Seznam námi připravovaných mutantů proteinu FOXO4 82–207. Mutanty u nichž jsem prováděla cílenou mutagenézi osobně, jsou označeny hvězdičkou a červenou výplní.

Mutace FOXO4 82–207			
R94A	S142A	R151K	K162A
N95A*	N148A*	H152A*	S171A
S101A	S149A	N153A	S172A
Y102F	R151A*	S155A	G184Stop*

Po provedení cílené mutagenéze byla plasmidová DNA v úseku kódujícím protein FOXO4 82–207 nechána osekvenovat v Laboratoři sekvenace DNA na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Přítomnost správné mutace byla poté ve všech sekvencích překontrolována.

### 5.2 Purifikace proteinů FOXO4 82–207

Po expresi proteinů FOXO4 82–207 následovala jejich purifikace, vzhledem k velkému množství připravovaných proteinů je v této práci dokumentována pouze purifikace jednoho z nich – mutantu R151A. Purifikace všech ostatních proteinů FOXO4 82–207 byla provedena stejným způsobem a výsledky purifikace byly obdobné.

Všechny námi purifikované proteiny FOXO4 82–207 jsou uvedeny v tabulce 5.2. Osobně jsem purifikovala 10 z těchto proteinů, tyto jsou v tabulce 5.2 označeny hvězdičkou a červenou výplní.

**Tabulka 5.2** Seznam námi purifikovaných proteinů FOXO4 82–207. Proteiny, jejichž purifikaci jsem prováděla osobně, jsou označeny hvězdičkou a červenou výplní.

Proteiny FOXO4 82–207			
WT*	S142A	R151K*	K162A
R94A	N148A*	H152A*	S171A*
N95A*	S149A	N153A*	S172A
S101A*	R151A*	S155A	G184Stop*
Y102F			

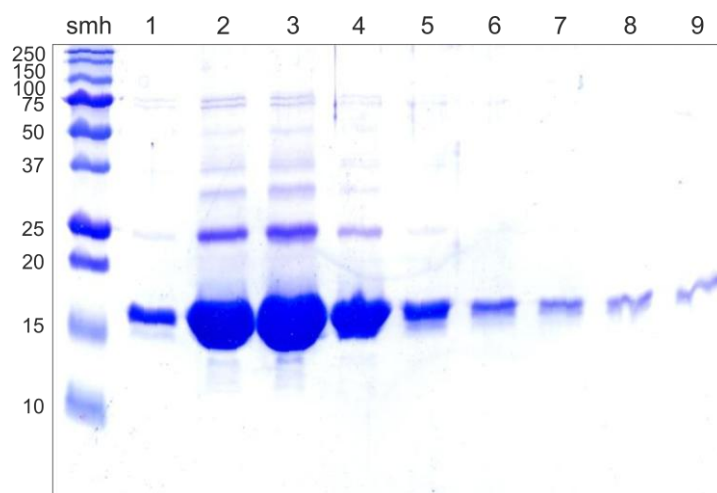
Purifikace proteinů FOXO4 82–207 se skládala ze tří hlavních kroků – z niklové chelatační chromatografie, kationtově výměnné chromatografie a gelové permeační chromatografie. Dále zahrnovala také dialýzu. Po každém z hlavních purifikačních kroků byla provedena SDS–PAGE, která ukázala poměrné množství proteinu v jednotlivých frakcích, jeho čistotu a kvalitu (nepřítomnost degradačních produktů).

Provedením zvoleného purifikačního postupu bylo dosaženo velmi dobré čistoty a také kvality všech námi připravovaných proteinů FOXO4 82–207. Během předchozí optimalizace purifikačního protokolu byla zkontrolována primární struktura purifikovaného proteinu (především přítomnost kompletního C-konce proteinu náchylného k proteolytické degradaci) FOXO4 82–207 metodou hmotnostní spektroskopie (bez mé účasti).

### 5.2.1 Niklová chelatační chromatografie

Během eluce při niklové chelatační chromatografii bylo najímáno celkem 9 frakcí po 1,2 ml do mikrozkuvek. Z těchto frakcí byly odebrány vzorky pro SDS–PAGE. Na základě vizualizovaného gelu (obr. 5.1) byly vybrány frakce (v případě mutantního proteinu R151A FOXO4 82–207 frakce 2 – 4), které byly sloučeny a podrobeny dalším purifikačním krokům. SDS–PAGE provedená po niklové chelatační chromatografii také ukázala, že proteiny FOXO4 82–207 ve fúzi s His-tag byly exprimovány v dostatečném množství. Relativní molekulová hmotnost námi připravovaných proteinů FOXO4 82–207

se pohybuje okolo hodnoty 16500 s výjimkou mutantního proteinu G184Stop FOXO4 82–207, který je zkrácen na svém C-konci a jehož relativní molekulová hmotnost je přibližně 14000. Relativní molekulové hmotnosti proteinů byly vypočítány na základě jejich primární struktury pomocí nástroje ProtParam na <http://www.expasy.org>. Z vizualizovaného gelu po SDS–PAGE provedené po niklové chelatační chromatografii s mutantním proteinem R151A FOXO4 82–207 ( $M_r = 16492,4$ ) je zřejmé, že hlavní zóna odpovídá žádanému proteinu.

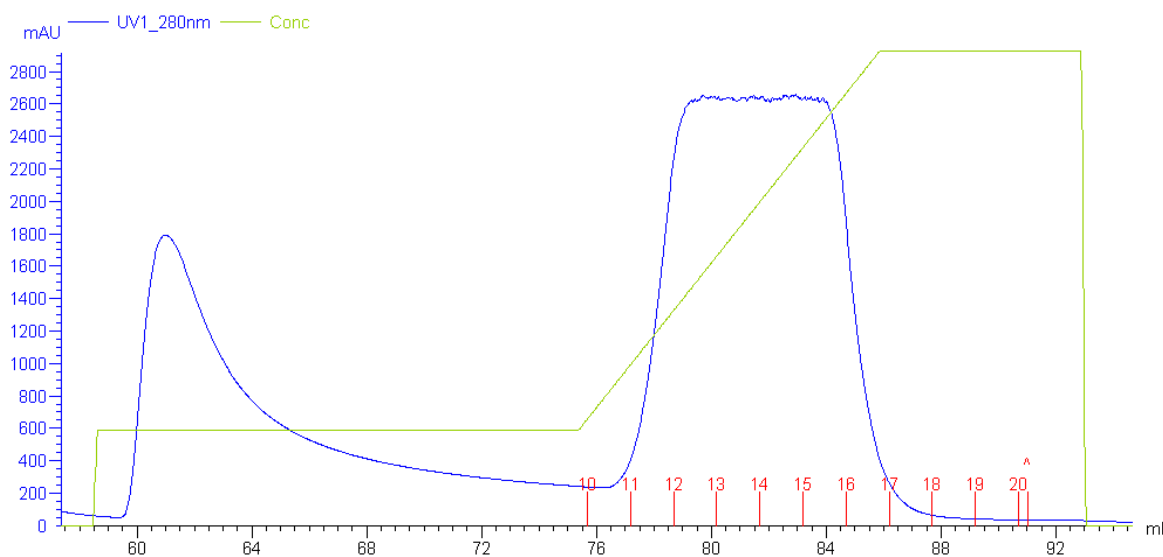


**Obr. 5.1** Vizualizovaný gel po SDS–PAGE provedené po niklové chelatační chromatografii s mutantním proteinem R151A FOXO4 82–207. Do první jamky zleva bylo naneseno 12  $\mu\text{l}$  standardu molekulových hmotností (uvedená relativní molekulová hmotnost fragmentů je vydělena faktorem  $10^3$ ). Do ostatních jamek byly naneseny vzorky z frakcí 2 – 10 (zleva v tomto pořadí). Vzorky nanášené na gel obsahovaly 5  $\mu\text{l}$  roztoku proteinu odebraného z dané frakce po niklové chelatační chromatografii, 5  $\mu\text{l}$  SDS vzorkového pufru a 10  $\mu\text{l}$  destilované vody. Celkový objem vzorků nanášených na gel byl 20  $\mu\text{l}$ .

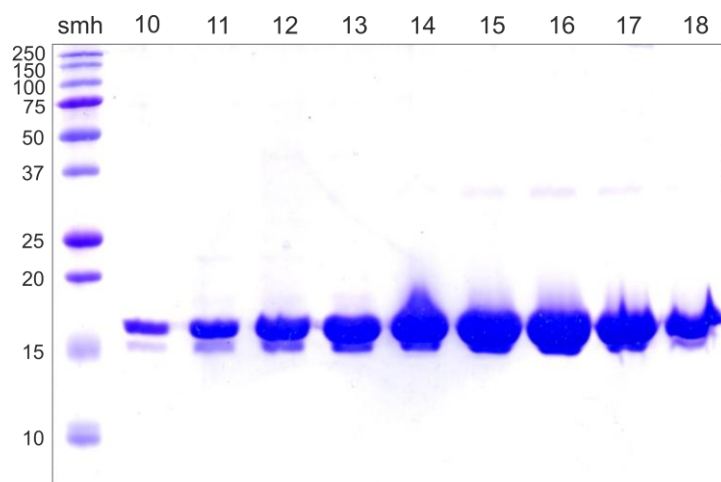
## 5.2.2 Kationtově výměnná chromatografie

Po niklové chelatační chromatografii byly proteiny podrobeny dialýze a následně kationtově výměnné chromatografii. Během eluce (obr. 5.2) byly jímány frakce po 0,5 ml do mikrozku mávek. Z frakcí 10 – 18 byly odebrány vzorky pro SDS–PAGE. Po vizualizaci gelu (obr. 5.3) byly vybrány frakce (v případě mutantního proteinu R151A FOXO4 82–207 frakce 14 – 16), které byly posléze sloučeny a postoupeny k poslednímu

purifikačnímu kroku. Pokud porovnáme gely na obrázcích 5.1 a 5.3 je patrné, že čistota proteinu se výrazně zlepšila.



**Obr. 5.2** Záznam průběhu oplachu a eluce při kationtové výměnné chromatografii. Modrá křivka znázorňuje závislost absorbance eluátu při vlnové délce 280 nm na čase. Zelená křivka znázorňuje teoretický gradient iontové síly. Červeně jsou označeny pozice jímaných frakcí.

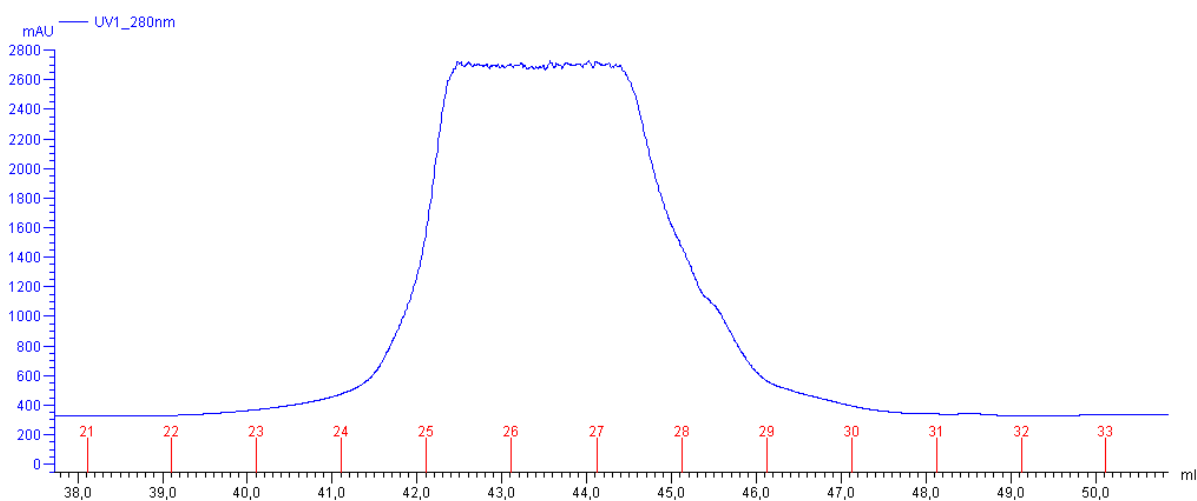


**Obr. 5.3** Vizualizovaný gel po SDS-PAGE provedené po kationtové výměnné chromatografii s mutantním proteinem R151A FOXO4 82–207. Do první jamky zleva bylo naneseno 12  $\mu$ l standardu molekulových hmotností (uvedená relativní molekulová hmotnost fragmentů je vydělena faktorem  $10^3$ ). Do ostatních jamek byly naneseny vzorky z frakcí 10 – 18 (zleva v tomto pořadí). Vzorky nanášené na gel obsahovaly 5  $\mu$ l roztoku proteinu odebraného z dané frakce po kationtové výměnné chromatografii, 5  $\mu$ l SDS

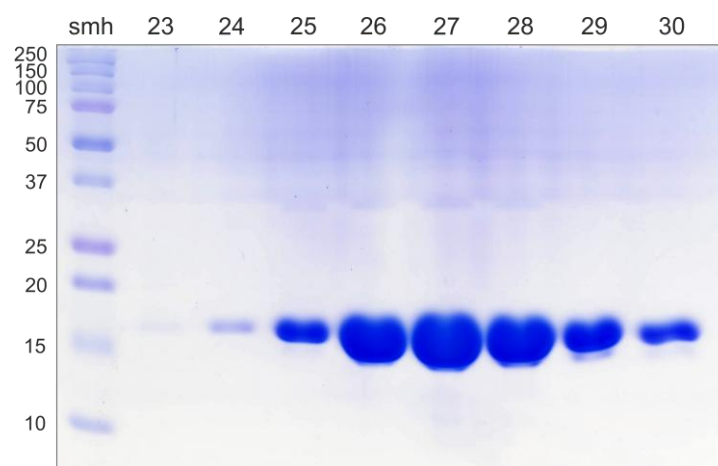
vzorkového pufru a 10  $\mu$ l destilované vody. Celkový objem vzorků nanášených na gel byl 20  $\mu$ l.

### 5.2.3 Gelová permeační chromatografie

Během eluce při gelové permeační chromatografii (obr. 5.4) byly jímány frakce po 0,5 ml do mikrozku mávek. Z frakcí 23 – 30 byly odebrány vzorky pro SDS–PAGE. Po vizualizaci gelu (obr. 5.5) byly sloučeny pouze nejlepší frakce (v případě mutantního proteinu R151A FOXO4 82–207 frakce 25 – 28), které obsahovaly čistý protein s pouze minimálním podílem degradačních produktů.



**Obr. 5.4** Záznam průběhu eluce při gelové permeační chromatografii. Modrá křivka znázorňuje závislost absorbance eluátu při vlnové délce 280 nm na čase. Červeně jsou označeny pozice jímáných frakcí.



**Obr. 5.5** Vizualizovaný gel po SDS–PAGE provedené po gelové permeační chromatografii s mutantním proteinem R151A FOXO4 82–207. Do první jamky zleva bylo naneseno 10  $\mu$ l standardu molekulových hmotností (uvedená relativní molekulová hmotnost fragmentů je vydělena faktorem  $10^3$ ). Do ostatních jamek byly naneseny vzorky z frakcí 23 – 30 (zleva v tomto pořadí). Vzorky nanášené na gel obsahovaly 5  $\mu$ l roztoku proteinu odebraného z dané frakce po gelové permeační chromatografii, 5  $\mu$ l SDS vzorkového pufru a 10  $\mu$ l destilované vody. Celkový objem vzorků nanášených na gel byl 20  $\mu$ l.

### **5.3 Srovnání vazebné afinity proteinu FOXO4 82–207 k různým dsDNA lišícím se v sekvenci předcházející hlavní vazebný motiv**

Jedním z hlavních cílů této diplomové práce bylo pokusit se potvrdit či vyvrátit hypotézu říkající, že vyšší počet A-T vs. C-G párů v sekvenci předcházející hlavní vazebný motiv FOXO transkripčních faktorů usnadňuje interakci DNA se segmentem W2 v DNA-vazebné doméně FOXO proteinů. Usnadnění interakce by spočívalo ve zvýšení flexibility DNA v důsledku menšího počtu vodíkových můstků mezi A-T páry. Pro sledování vazebné afinity proteinu FOXO4 82–207 k různým dsDNA lišícím se v sekvenci předcházející hlavní vazebný motiv jsme si vybrali metody nativní elektroforéza a stacionární anizotropie fluorescence. Nativní elektroforéza je metoda poskytující pouze orientační srovnání vazebných afinit, zatímco měřením změn stacionární anizotropie fluorescence lze získat disociační konstanty komplexů.

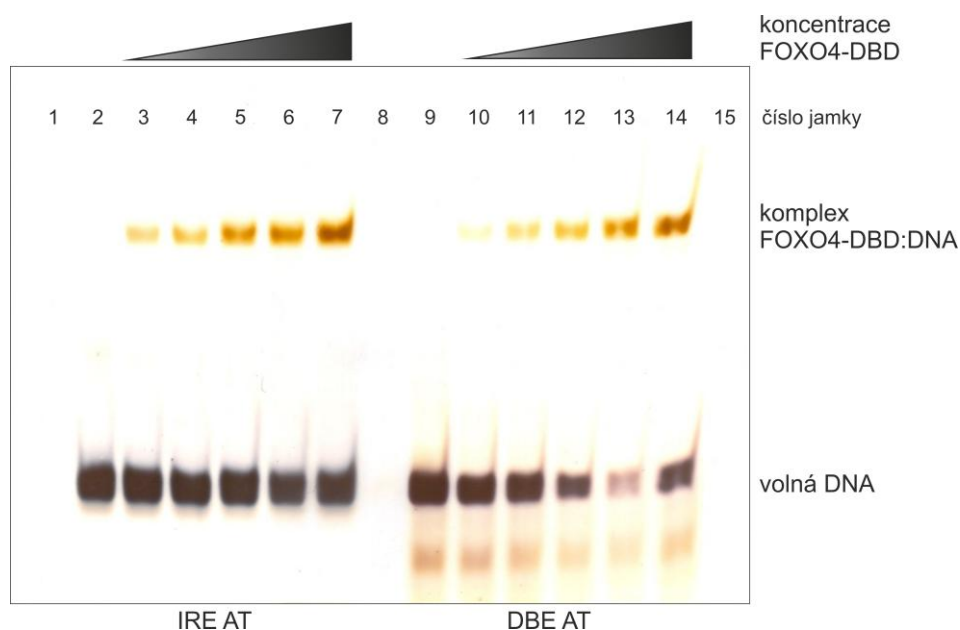
### 5.3.1 Nativní elektroforéza

Pro nativní elektroforézu byl použit purifikovaný protein FOXO4 82–207 WT a čtyři různé dsDNA, jejichž sekvence jsou uvedené v tabulce 5.3.

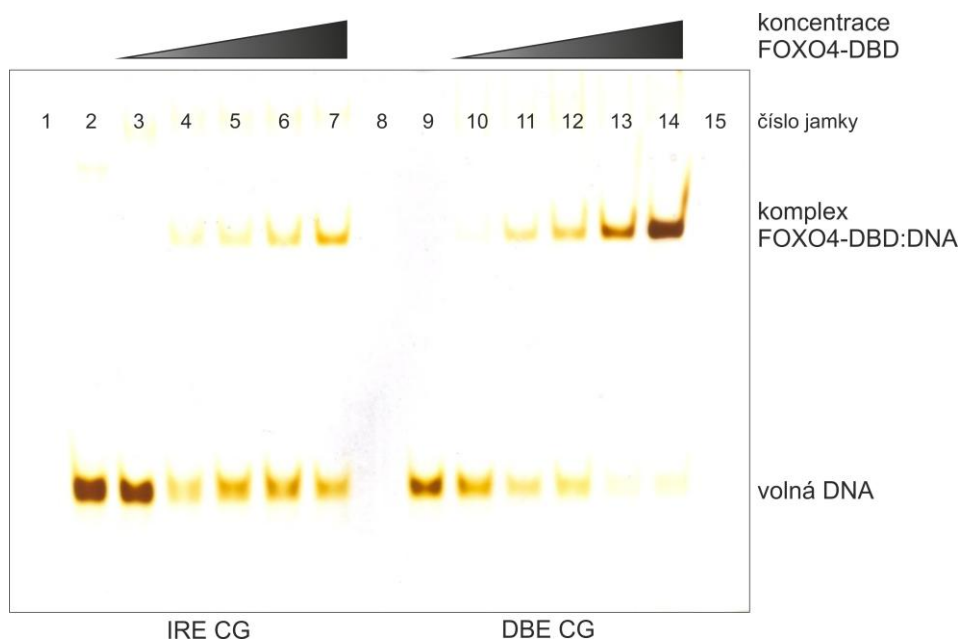
**Tabulka 5.3** Sekvence dsDNA použitých při nativní elektroforéze. Oranžovou barvou jsou označeny báze, kterými se jednotlivé dsDNA liší. Tučně je zvýrazněn hlavní vazebný motiv FOXO faktorů, který existuje ve dvou variantách, které se liší v prvních dvou bázích; tyto jsou pro IRE motiv označeny zeleně a pro DBE motiv modře.

označení	sekvence	
IRE AT	5' –	GAAAAAAAAA <b>CAAAACAA</b> AAG – 3'
	3' –	C <b>TTTTTTTT</b> <b>GT</b> TTT <b>GT</b> TTTC – 5'
IRE CG	5' –	GGGGGGGGG <b>CAAAACAA</b> AAG – 3'
	3' –	CCCCCCCC <b>GT</b> TTT <b>GT</b> TTTC – 5'
DBE AT	5' –	GAAAAAAAAA <b>GTAAACAA</b> AAG – 3'
	3' –	C <b>TTTTTTTT</b> <b>CA</b> TTT <b>GT</b> TTTC – 5'
DBE CG	5' –	GGGGGGGGG <b>GTAAACAA</b> AAG – 3'
	3' –	CCCCCCCC <b>CA</b> TTT <b>GT</b> TTTC – 5'

Na obrázcích 5.6 a 5.7 jsou gely, ve kterých proběhla nativní elektroforéza a které byly následně vizualizovány metodou barvení stříbrem. Složení vzorků nanesených do jednotlivých jamek gelů je uvedeno v tabulce 4.1 na str. 51. Jelikož stříbro barví různě DNA o různém množství A-T respektive C-G párů v sekvenci, nelze srovnávat vzorky obsahující IRE AT se vzorky obsahující IRE CG a stejně tak vzorky obsahující DBE AT se vzorky obsahující DBE CG, lze srovnávat pouze vzorky obsahující IRE AT se vzorky obsahující DBE AT (viz obr. 5.6) a samozřejmě vzorky obsahující IRE CG se vzorky obsahující DBE CG (viz obr. 5.7).



**Obr. 5.6** Výsledek nativní elektroforézy vzorků obsahujících protein FOXO4 82–207 WT a DNA obsahující v sekvenci předcházející hlavní vazebný motiv A-T páry. Jamky číslo 1, 2 a 9 byly použity pro negativní kontroly; do jamky číslo 1 byl nanesen samotný protein FOXO4 82–207 WT, do jamky číslo 2 byla nanesena samotná DNA IRE AT a do jamky číslo 9 byla nanesena samotná DNA DBE AT. Do jamek číslo 3 – 7 a 10 – 14 byla nanesena daná DNA + vzrůstající množství proteinu FOXO4 82–207 WT. Jamky 8 a 15 zůstaly prázdné.



**Obr. 5.7** Výsledek nativní elektroforézy vzorků obsahujících protein FOXO4 82–207 WT a DNA obsahující v sekvenci předcházející hlavní vazebný motiv C-G páry. Jamky číslo 1, 2 a 9 byly použity pro negativní kontroly; do jamky číslo 1 byl nanesen samotný protein FOXO4 82–207 WT, do jamky číslo 2 byla nanesena samotná DNA IRE CG a do jamky číslo 9 byla nanesena samotná DNA DBE CG. Do jamek číslo 3 – 7 a 10 – 14 byla nanesena daná DNA + vzrůstající množství proteinu FOXO4 82–207 WT. Jamky 8 a 15 zůstaly prázdné.

Na obou vizualizovaných gelech z obrázků 5.6 a 5.7 lze sledovat vznik komplexu FOXO4-DBD:DNA a zároveň postupný úbytek volné DNA, jak přechází do komplexu. Srovnání vazebných afinit je v případě této metody pouze orientační. Lze říci, že protein FOXO4 82–207 WT vázal DNA obsahující A-T páry v sekvenci předcházející hlavní vazebný motiv v případě IRE i DBE motivu s přibližně stejnou afinitou a DNA obsahující C-G páry v sekvenci předcházející hlavní vazebný motiv v případě DBE motivu s vyšší afinitou než v případě IRE motivu. Vyšší vazebná afinita FOXO proteinů k DNA obsahující DBE motiv než k DNA obsahující IRE motiv byla prokázána již v dřívějších studiích (Furuyama *et al.*, 2000). Vzhledem k tomu, že DNA o různém množství A-T respektive C-G párů v sekvenci se stříbrem barví různě, je tato metoda nevhodná pro porovnání vazebné afinity FOXO4 82–207 WT k DNA lišícím se obsahem A-T vs. C-G párů v sekvenci předcházející hlavní vazebný motiv.

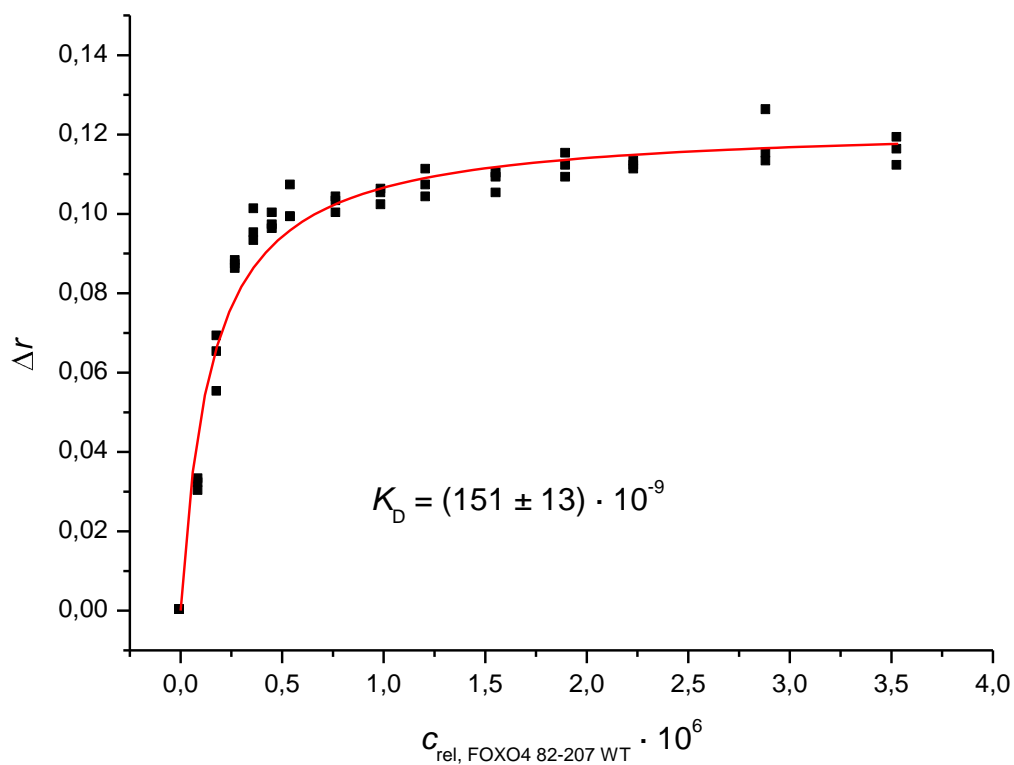
### 5.3.2 Stacionární anizotropie fluorescence

Pro měření stacionární anizotropie fluorescence byl v této vazebné eseji použit purifikovaný protein FOXO4 82–207 WT a čtyři různé fluoresceinem značené dsDNA, jejichž sekvence jsou uvedené v tabulce 5.4. Každé měření bylo provedeno třikrát nezávisle. Grafy závislosti změny anizotropie fluorescence ( $\Delta r$ ) vzorku obsahujícího molekuly dsDNA příslušné sekvence a molekuly FOXO4 82–207 WT na relativní koncentraci FOXO4 82–207 WT ( $c_{\text{rel, FOXO4 82-207}}$ ) jsou uvedeny na obr. 8, obr. 9, obr. 10 a obr. 11.

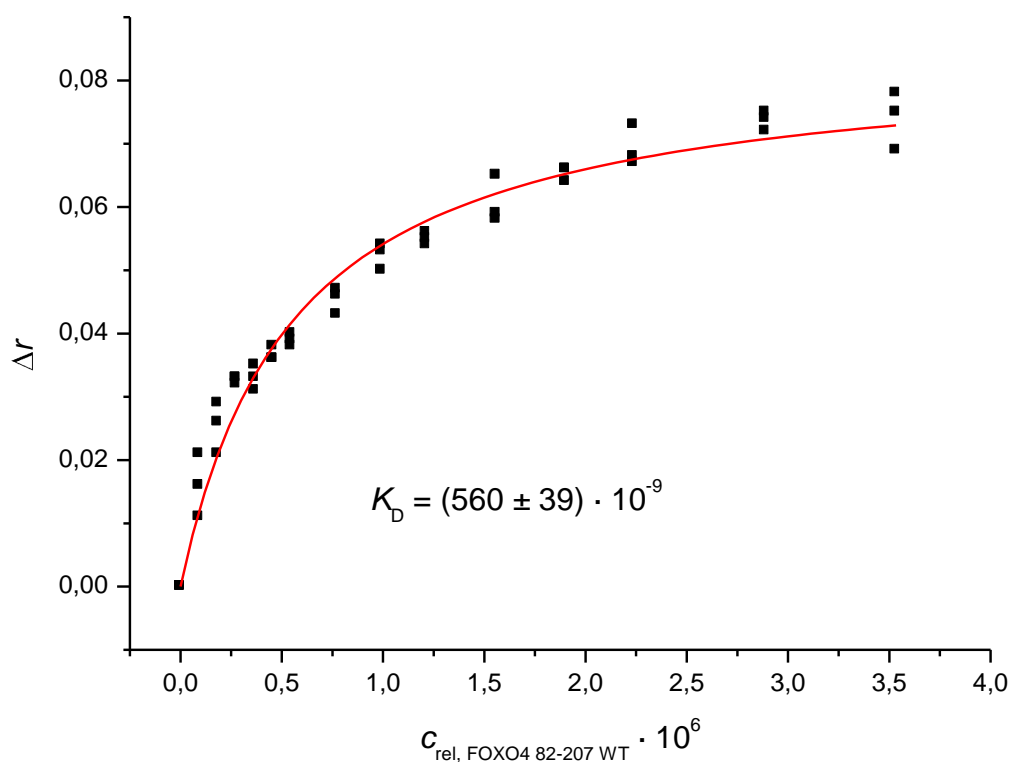
**Tabulka 5.4** Sekvence dsDNA použitých při měření stacionární anizotropie fluorescence.

Oranžovou barvou jsou označeny báze, kterými se jednotlivé dsDNA liší. Tučně je zvýrazněn hlavní vazebný motiv FOXO faktorů, který existuje ve dvou variantách, které se liší v prvních dvou bázích; tyto jsou pro IRE motiv označeny zeleně a pro DBE motiv modře.

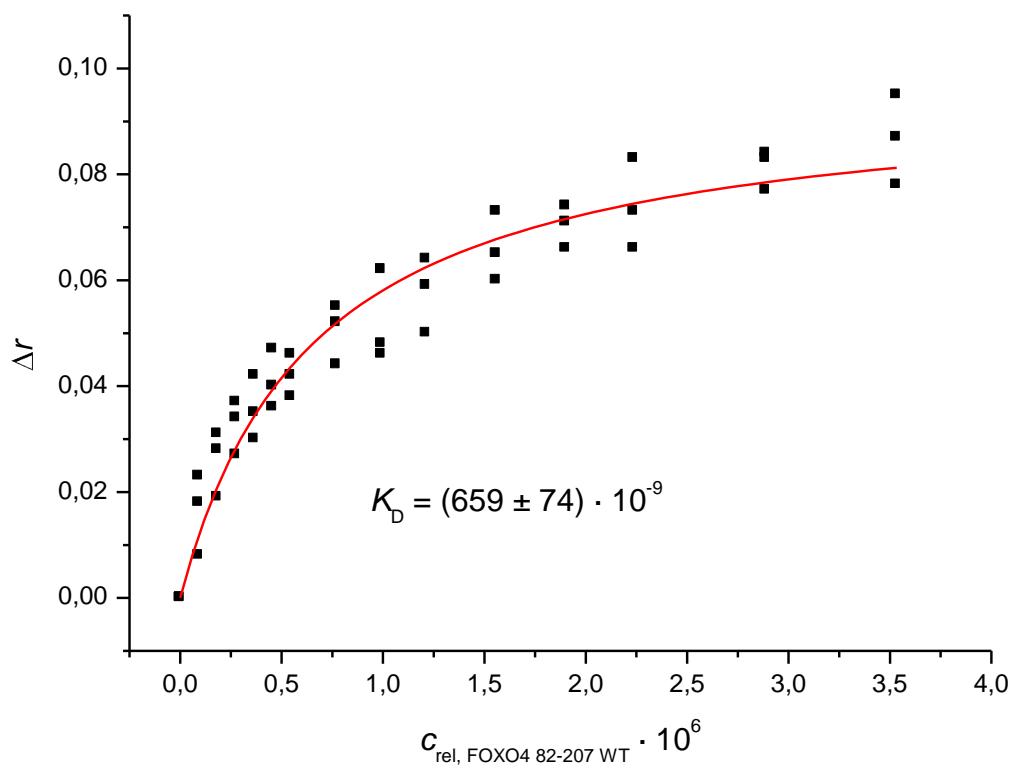
označení	sekvence	
Flc IRE AT	5' – Flc –	GAAAAAAAAA <b>CAAACAAAAG</b> – 3'
	3' –	C <b>TTTTTTTT</b> <b>GTTTTGTTTTC</b> – 5'
Flc IRE CG	5' – Flc –	GGGGGGGGG <b>CAAACAAAAG</b> – 3'
	3' –	CCCCCCCC <b>GTTTTGTTTTC</b> – 5'
Flc DBE AT	5' – Flc –	GAAAAAAAAA <b>GTAAACAAAAG</b> – 3'
	3' –	C <b>TTTTTTTT</b> <b>CATTTGTTTTC</b> – 5'
Flc DBE CG	5' – Flc –	GGGGGGGGG <b>GTAAACAAAAG</b> – 3'
	3' –	CCCCCCCC <b>CATTTGTTTTC</b> – 5'



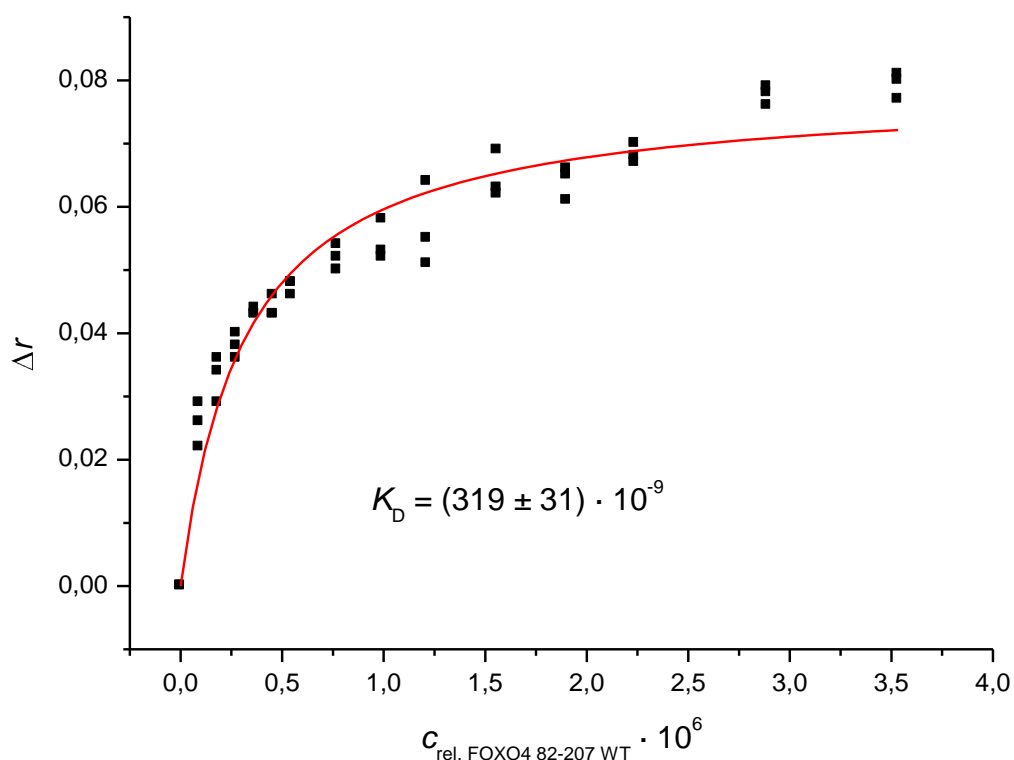
**Obr. 5.8** Graf závislosti změny anizotropie fluorescence ( $\Delta r$ ) vzorku obsahujícího molekuly dsDNA sekvence značené Flc IRE AT a molekuly FOXO4 82–207 WT na relativní koncentraci FOXO4 82–207 WT ( $c_{\text{rel, FOXO4 82–207}}$ ). V grafu je uvedena hodnota  $K_D$  získaná proložením experimentálních bodů rovnicí (5). Graf obsahuje body ze tří nezávislých měření a uvedená chyba je chyba proložení. Sekvence Flc IRE AT je 5'-Flc-GAAAAAAAAACAAAACAAAAG-3'; komplementární vlákno fluorescein neobsahuje.



**Obr. 5.9** Graf závislosti změny anizotropie fluorescence ( $\Delta r$ ) vzorku obsahujícího molekuly dsDNA sekvence značené Flc IRE CG a molekuly FOXO4 82–207 WT na relativní koncentraci FOXO4 82–207 WT ( $c_{\text{rel, FOXO4 82–207}}$ ). V grafu je uvedena hodnota  $K_D$  získaná proložením experimentálních bodů rovnicí (5). Graf obsahuje body ze tří nezávislých měření a uvedená chyba je chyba proložení. Sekvence Flc IRE CG je 5'-Flc-GGGGGGGGGCAAACAAAAG-3'; komplementární vlákno fluorescein neobsahuje.



**Obr. 5.10** Graf závislosti změny anizotropie fluorescence ( $\Delta r$ ) vzorku obsahujícího molekuly dsDNA sekvence značené Flc DBE AT a molekuly FOXO4 82–207 WT na relativní koncentraci FOXO4 82–207 WT ( $c_{\text{rel, FOXO4 82–207}}$ ). V grafu je uvedena hodnota  $K_D$  získaná proložením experimentálních bodů rovnicí (5). Graf obsahuje body ze tří nezávislých měření a uvedená chyba je chyba proložení. Sekvence Flc DBE AT je 5'-Flc-GAAAAAAAAAGTAAACAAAAG-3'; komplementární vlákno fluorescein neobsahuje.



**Obr. 5.11** Graf závislosti změny anizotropie fluorescence ( $\Delta r$ ) vzorku obsahujícího molekuly dsDNA sekvence značené Flc DBE CG a molekuly FOXO4 82–207 WT na relativní koncentraci FOXO4 82–207 WT ( $c_{\text{rel, FOXO4 82–207 WT}}$ ). V grafu je uvedena hodnota  $K_D$  získaná proložením experimentálních bodů rovnicí (5). Graf obsahuje body ze tří nezávislých měření a uvedená chyba je chyba proložení. Sekvence Flc DBE CG je 5'-Flc-GGGGGGGGGTAAACAAAAG-3'; komplementární vlákno fluorescein neobsahuje.

Výsledky měření stacionární anizotropie fluorescence shrnuje tabulka 5.5.

**Tabulka 5.5** Výsledky měření stacionární anizotropie fluorescence.

	$K_D/10^{-9}$
	FOXO4 82–207 WT
Flc IRE AT	151 ± 13
Flc IRE CG	560 ± 39
Flc DBE AT	659 ± 74
Flc DBE CG	319 ± 31

Na základě výsledků měření stacionární anizotropie fluorescence můžeme říci, že množství A-T vs. C-G párů v sekvenci předcházející hlavní vazebný motiv má různý vliv na DNA-vazebnou afinitu proteinu FOXO4 82–207 WT v případě DNA obsahující IRE motiv a v případě DNA obsahující DBE motiv. Vyšší obsah A-T vs. C-G párů v sekvenci předcházející hlavní vazebný motiv, a tím vyšší flexibilita tohoto úseku DNA, má výrazný pozitivní efekt na DNA-vazebnou afinitu proteinu FOXO4 82–207 WT pouze v případě vazby na DNA obsahující IRE motiv. U DNA obsahující DBE motiv je vliv na DNA-vazebnou afinitu FOXO4 82–207 WT opačný a podstatně menší. Zdá se, že větší flexibilita DNA v oblasti předcházející hlavní vazebný motiv skutečně usnadňuje interakci se segmentem W2 forkhead domény, ale pouze když tato DNA obsahuje IRE motiv.

## **5.4 Porovnání DNA-vazebné afinity proteinů FOXO4 82–207 nesoucích vybrané bodové mutace**

Dalším z hlavních cílů této diplomové práce bylo studium významu nespecifických slabých interakcí (zejména vodných můstků) pro stabilitu komplexu FOXO4-DBD s DNA. Pro toto studium bylo připraveno 16 proteinů FOXO4 82–207 nesoucích různé bodové mutace. Pro porovnání DNA-vazebné afinity těchto proteinů byla vybrána metoda rezonance povrchového plasmonu a výsledky získané touto metodou byly v několika případech navíc ověřeny metodou stacionární anizotropie fluorescence.

### **5.4.1 Rezonance povrchového plasmonu**

Měření rezonance povrchového plasmonu s námi připravenými vzorky bylo provedeno Mgr. Ladislavem Bumbou Ph.D. na Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v. v. i.

Pro měření rezonance povrchového plasmonu byly použity tři různé biotinem značené dsDNA včetně jedné negativní kontroly (DNA o stejné délce s náhodnou sekvencí neobsahující hlavní vazebný motiv), jejichž sekvence jsou uvedené v tabulce 5.6 a purifikované proteiny FOXO4 82–207 WT a 16 různých mutantů včetně tří negativních kontrol (proteiny obsahující mutace, u nichž bylo v dřívějších studiích prokázáno, že mají výrazný negativní vliv na DNA-vazebnou afinitu FOXO4 82–207) (viz tabulka 5.7).

**Tabulka 5.6** Sekvence dsDNA použitých při měření povrchové plasmonové rezonance.

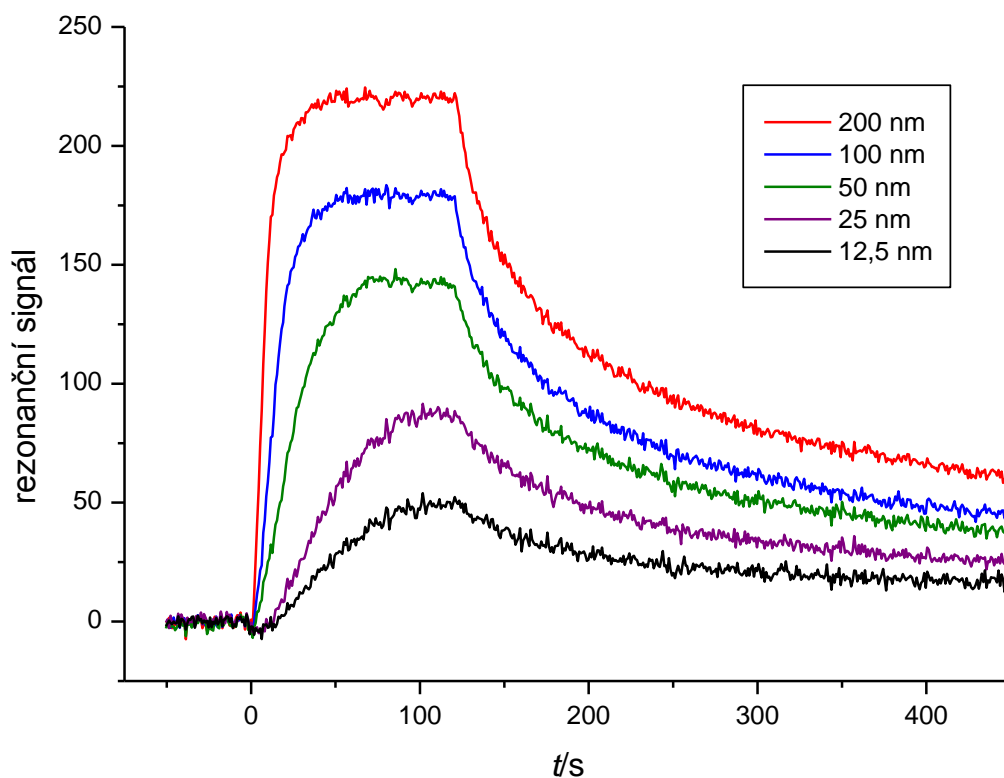
Tučně je zvýrazněn hlavní vazebný motiv FOXO faktorů, který existuje ve dvou variantách, které se liší v prvních dvou bázích; tyto jsou pro DBE motiv označeny modře a pro IRE motiv zeleně. Sekvence SPR random sloužila jako negativní kontrola.

označení	sekvence
SPR DBE	5' – biotin – GACTAT <b>GTAAACA</b> ACGC – 3'
	3' – CTGATA <b>CATTTGTT</b> GCG – 5'
SPR IRE	5' – biotin – GACTAT <b>CAAACA</b> ACGC – 3'
	3' – CTGATA <b>GTTTT</b> GTTGCG – 5'
SPR random	5' – biotin – AACGTATGCTCTAGCCA – 3'
	3' – TTGCATACGAGATCGGT – 5'

**Tabulka 5.7** Seznam proteinů FOXO4 82–207 použitých při měření rezonance povrchového plasmonu. Hvězdičkou a tmavě šedou výplní jsou označeny mutantní proteiny, které sloužily jako negativní kontroly.

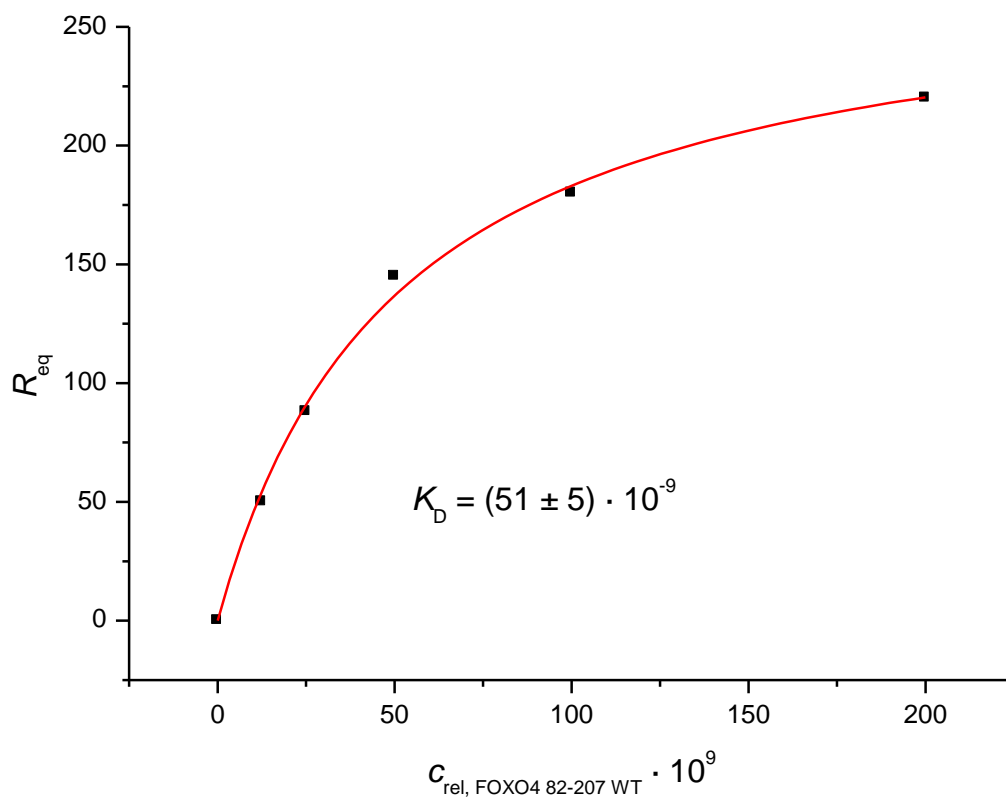
Proteiny FOXO4 82–207			
WT	S142A	R151K	K162A
R94A	N148A*	H152A*	S171A
N95A	S149A	N153A	S172A
S101A	R151A	S155A	G184Stop*
Y102F			

Na obr. 5.12 je příklad senzogramu získaného z metody rezonance povrchového plasmonu.



**Obr. 5.12** Senzogram získaný z metody rezonance povrchového plasmonu pro vazbu proteinu FOXO4 82–207 WT na dsDNA obsahující IRE motiv. Barvami linií jsou rozlišeny různé koncentrace proteinu FOXO4 82–207 WT v měřených vzorcích.

Na obr. 5.13 je příklad grafu závislosti rezonančního signálu SPR v rovnováze ( $R_{eq}$ ) při vazbě FOXO4 82–207 na dsDNA na relativní koncentraci FOXO4 82–207 ( $c_{rel, FOXO4\ 82-207}$ ).



**Obr. 5.13** Graf závislosti rezonančního signálu SPR v rovnováze ( $R_{eq}$ ) při vazbě FOXO4 82–207 WT na dsDNA sekvenci SPR IRE na relativní koncentraci FOXO4 82–207 WT ( $c_{rel, FOXO4 82-207 WT}$ ). V grafu je uvedena hodnota  $K_D$  získaná proložení experimentálních bodů rovnicí (6). Uvedená chyba je chyba proložení. Sekvence SPR IRE je 5'-biotin-GACTATCAAAACAACGC-3'; komplementární vlákno biotin neobsahuje.

**Tabulka 5.8** Výsledky měření rezonance povrchového plasmonu. Hvězdičkou jsou označeny mutantní proteiny, které sloužily jako negativní kontroly. Barvy výplně reflektují relativní změny ve vazebné afinitě: čím je barva výplně tmavší, tím je změna v  $K_D$  (ve srovnání s  $K_D$  komplexu FOXO4-DBD WT s příslušným typem DNA) větší. Modrá škála je vyhrazena pro střední změny v  $K_D$  ( $2\times - 3\times$ ) a fialová škála pro výrazné změny v  $K_D$  ( $>4\times$ ).

protein	element sekundární struktury	$K_D/10^{-9}$	
		SPR IRE	SPR DBE
WT		51 ± 5	18 ± 3
R94A	N-konec	79 ± 8	24 ± 3
N95A	N-konec	98 ± 8	42 ± 3
S101A	H1	121 ± 12	38 ± 4
Y102F	H1	216 ± 27	61 ± 5
S142A	H4	41 ± 4	17 ± 3
N148A*	H3	150 ± 15	77 ± 11
S149A	H3	114 ± 12	19 ± 6
R151A	H3	87 ± 9	60 ± 12
R151K	H3	38 ± 9	15 ± 4
H152A*	H3	268 ± 45	130 ± 16
N153A	H3	164 ± 18	34 ± 5
S155A	H3	200 ± 31	65 ± 13
K162A	S2	128 ± 23	54 ± 8
S171A	W1	60 ± 7	18 ± 3
S172A	W1	93 ± 5	30 ± 4
G184Stop*	W2	269 ± 38	297 ± 41

Z výsledků měření rezonance povrchového plasmonu, které shrnuje tabulka 5.8, je patrné, že význam jednotlivých kontaktů se výrazně liší a že i zrušení pouze jediného nesespecifického kontaktu (Y102F) může výrazně snížit DNA-vazebnou afinitu FOXO4-DBD. Výsledky dále ukazují, že mutace v různých částech forkhead domény mají různý vliv na stabilitu komplexu FOXO4-DBD:DNA, např. mutace v helixech H1 a H3 a segmentu W2 tento komplex signifikantně destabilizují, zatímco mutace v ohybu W1 a helixu H4 vliv na stabilitu komplexu nemají.

## 5.4.2 Stacionární anizotropie fluorescence

Pro měření stacionární anizotropie fluorescence byl v této vazebné eseji použit pouze jeden typ dsDNA značené fluoresceinem, jejíž sekvence je uvedena v tabulce 5.9 a purifikované proteiny FOXO4 82–207 WT a 3 vybrané mutanty včetně jedné negativní kontroly (viz tabulka 5.10). Každé měření bylo provedeno třikrát nezávisle. Grafy závislosti změny anizotropie fluorescence ( $\Delta r$ ) vzorku obsahujícího molekuly dsDNA sekvence označené Flc DBE a molekuly FOXO4 82–207 na relativní koncentraci FOXO4 82–207 ( $c_{\text{rel, FOXO4 82-207}}$ ) jsou uvedeny na obr. 14, obr. 15, obr. 16 a obr. 17.

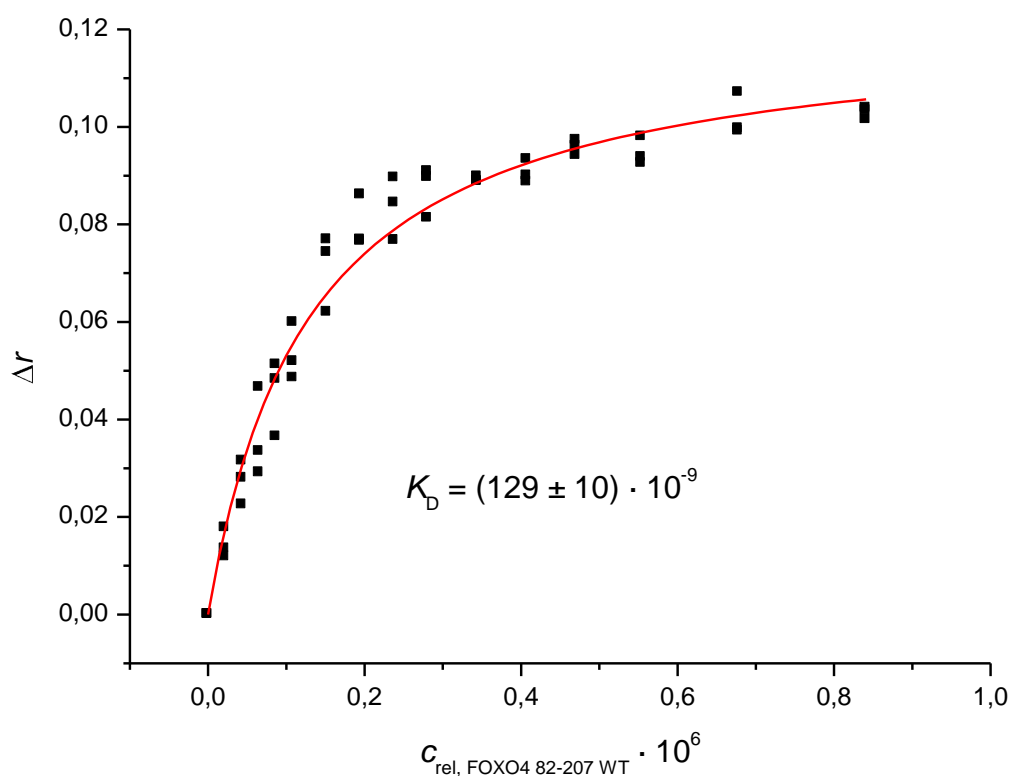
**Tabulka 5.9** Sekvence dsDNA použité při měření stacionární anizotropie fluorescence.

Tučně je zvýrazněn hlavní vazebný motiv FOXO faktorů (DBE varianta).

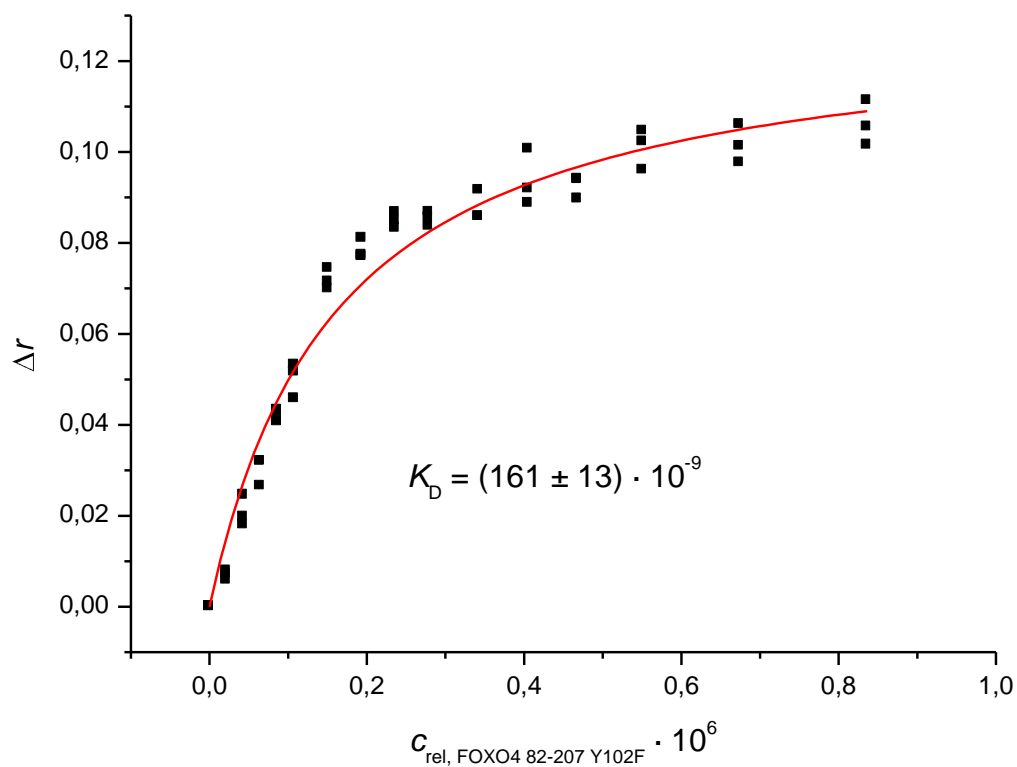
označení	sekvence
Flc DBE	5' – Flc – CTAT <b>GTAAACA</b> CGC – 3'
	3' – GATA <b>CATTTGTT</b> GCG – 5'

**Tabulka 5.10** Seznam proteinů FOXO4 82–207 použitých při měření stacionární anizotropie fluorescence. Hvězdičkou a tmavě šedou výplní je označen mutantní protein, který sloužil jako negativní kontrola.

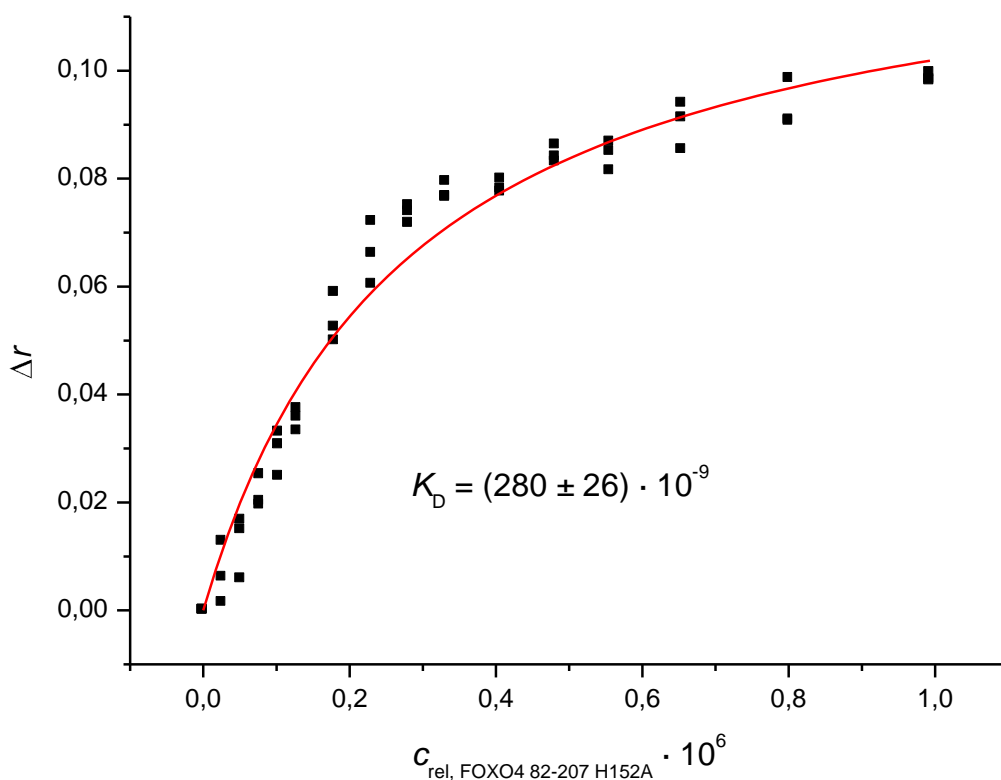
Proteiny FOXO4 82–207	
WT	H152A*
Y102F	S155A



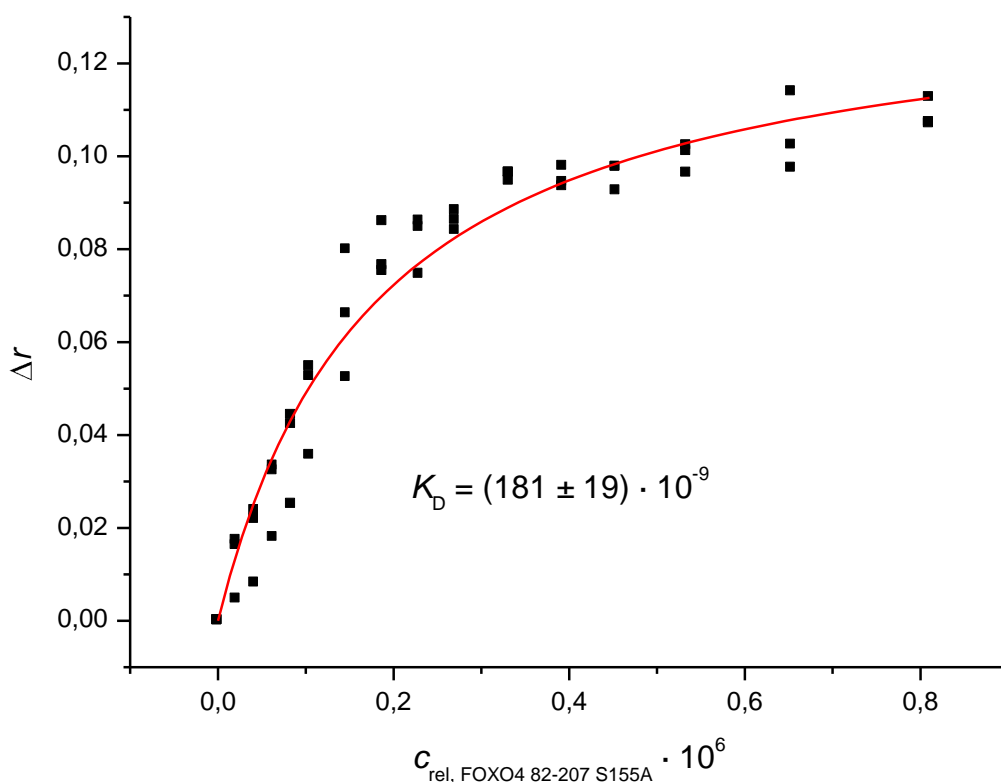
**Obr. 5.14** Graf závislosti změny anizotropie fluorescence ( $\Delta r$ ) vzorku obsahujícího molekuly dsDNA sekvence značené Flc DBE a molekuly FOXO4 82–207 WT na relativní koncentraci FOXO4 82–207 WT ( $c_{\text{rel, FOXO4 82–207 WT}}$ ). V grafu je uvedena hodnota  $K_D$  získaná proložením experimentálních bodů rovnicí (5). Graf obsahuje body ze tří nezávislých měření a uvedená chyba je chyba proložení. Sekvence Flc DBE je 5'-Flc-CTATGTAAACAACGC-3'; komplementární vlákno fluorescein neobsahuje.



**Obr. 5.15** Graf závislosti změny anizotropie fluorescence ( $\Delta r$ ) vzorku obsahujícího molekuly dsDNA sekvence značené Flc DBE a molekuly FOXO4 82–207 Y102F na relativní koncentraci FOXO4 82–207 Y102F ( $c_{\text{rel, FOXO4 82–207 Y102F}}$ ). V grafu je uvedena hodnota  $K_D$  získaná proložením experimentálních bodů rovnicí (5). Graf obsahuje body ze tří nezávislých měření a uvedená chyba je chyba proložení. Sekvence Flc DBE je 5'-Flc-CTATGTAACAACGC-3'; komplementární vlákno fluorescein neobsahuje.



**Obr. 5.16** Graf závislosti změny anizotropie fluorescence ( $\Delta r$ ) vzorku obsahujícího molekuly dsDNA sekvence značené Flc DBE a molekuly FOXO4 82–207 H152A na relativní koncentraci FOXO4 82–207 H152A ( $c_{\text{rel, FOXO4 82–207 H152A}}$ ). V grafu je uvedena hodnota  $K_D$  získaná proložením experimentálních bodů rovnicí (5). Graf obsahuje body ze tří nezávislých měření a uvedená chyba je chyba proložení. Sekvence Flc DBE je 5'-Flc-CTATGTAAACAACGC-3'; komplementární vlákno fluorescein neobsahuje.



**Obr. 5.17** Graf závislosti změny anizotropie fluorescence ( $\Delta r$ ) vzorku obsahujícího molekuly dsDNA sekvence značené Flc DBE a molekuly FOXO4 82–207 S155A na relativní koncentraci FOXO4 82–207 S155A ( $c_{\text{rel, FOXO4 82-207 S155A}}$ ). V grafu je uvedena hodnota  $K_D$  získaná proložení experimentálních bodů rovnicí (5). Graf obsahuje body ze tří nezávislých měření a uvedená chyba je chyba proložení. Sekvence Flc DBE je 5'-Flc-CTATGTAACAACGC-3'; komplementární vlákno fluorescein neobsahuje.

Výsledky měření stacionární anizotropie fluorescence shrnuje tabulka 5.11.

**Tabulka 5.11** Výsledky měření stacionární anizotropie fluorescence. Hvězdičkou je označen mutantní protein, který sloužil jako negativní kontrola.

	$K_D/10^{-9}$
	Flc DBE
WT	129 ± 10
Y102F	161 ± 13
H152A*	280 ± 26
S155A	181 ± 19

Měřením stacionární anizotropie fluorescence byly v několika vybraných případech ověřeny výsledky poskytnuté metodou rezonance povrchového plasmonu. Nelze srovnávat absolutní hodnoty disociačních konstant  $K_D$  komplexů FOXO4-DBD:DNA získaných dvěma různými metodami, ale můžeme porovnat trend hodnot, který, jak je zřejmé, souhlasí.

## 6 DISKUZE

Forkhead transkripční faktory jsou strukturně podobné proteiny obsahující přibližně 110 aminokyselin dlouhou evolučně konzervovanou DNA-vazebnou doménu, která je známá jako forkhead doména (Weigel a Jäckle, 1990). Existují různé podskupiny forkhead transkripčních faktorů a jednou z nich je podskupina „O“, do které náleží i protein FOXO4. Členy podskupiny FOXO jsou součástí mnoha základních buněčných procesů. Podílejí se především na kontrole metabolismu, kontrole buněčného cyklu, apoptóze, opravě poškozené DNA a ochraně vůči oxidativnímu stresu (Burgering, 2008).

Forkhead doménu FOXO faktorů tvoří tři  $\alpha$ -helixy (H1, H2 a H3), tři  $\beta$ -vlákna (S1, S2 a S3) a dva flexibilní ohyby zvané „křídla“ (z angl. wings) (W1 a W2). Hlavní DNA-vazebnou oblastí je helix H3, který interaguje s velkým žlábkem DNA (Clark *et al.*, 1993). Další části forkhead domény, které mohou vytvářet důležité kontakty s DNA, jsou obě křídla W1 a W2 (Clark *et al.*, 1993) a také N-koncový segment (Zheng *et al.*, 1999). Úloha křídla W2 při vazbě FOXO proteinů na DNA je nejasná. Segment W2 interaguje s oblastí DNA na 5' konci hlavního vazebného motivu, kde se nachází větší množství A-T vs. C-G párů. To vedlo k hypotéze, že vyšší počet A-T vs. C-G párů v sekvenci DNA předcházející hlavní vazebný motiv může usnadňovat interakci se segmentem W2 (Clark *et al.*, 1993; Tsai *et al.*, 2007; Brent *et al.*, 2008). Pro potvrzení této hypotézy byla exprimována a purifikována DNA-vazebná doména proteinu FOXO4 a byla určena její vazebná afinita ke čtyřem různým DNA metodou stacionární anizotropie fluorescence. Tyto DNA se lišily (i) typem hlavního vazebného motivu – tzv. IRE motiv (5'-CAAACAA-3') a tzv. DBE motiv (5'-GTAAACAA-3') – a (ii) obsahem A-T vs. C-G párů v oblasti před hlavním vazebným motivem. V případě IRE motivu byla zjištěna výrazně vyšší vazebná afinita DNA-vazebné domény FOXO4 k DNA s vyšším obsahem A-T vs. C-G párů v sekvenci předcházející hlavní vazebný motiv. V případě DNA obsahující DBE motiv byla situace opačná a efekt byl zároveň menší. Z tohoto vyplývá, že zmíněná hypotéza byla potvrzena pouze pro DNA obsahující IRE motiv.

Krystalová struktura komplexu DNA-vazebné domény proteinu FOXO4 s DNA naznačila, že na vazbě DNA-vazebné domény FOXO4 k DNA se specifickým způsobem podílejí jak přímé kontakty na báze i cukr-fosfátovou kostru DNA, tak i unikátní síť vodou zprostředkovaných interakcí (Boura *et al.*, 2010). Pro posouzení významnosti těchto

interakcí pro stabilitu komplexu DNA-vazebné domény FOXO4 s DNA byla připravena série mutantních forem DNA-vazebné domény FOXO4 a jejich DNA-vazebná afinita byla zkoumána metodou rezonance povrchového plasmu. Bylo zjištěno, že význam jednotlivých kontaktů v komplexu FOXO4-DBD:DNA se velmi liší. Výrazný negativní vliv mutací N148A a H152A na stabilitu komplexu FOXO4-DBD:DNA byl prokázán již v dřívějších studiích a není překvapivý, vzhledem k tomu, že postranní řetězce aminokyselin N148 a H152 vytvářejí veškeré specifické kontakty s bázemi hlavního vazebného motivu. Zajímavé je, že významně negativní vliv na stabilitu komplexu FOXO4-DBD:DNA může mít i zrušení pouze jediného nespecifického kontaktu, jako tomu je v případě mutace Y102F. Postranní řetězec Y102 vytváří jen jednu vodíkovou vazbu s fosfátovou skupinou cukr-fosfátové kostry DNA, přesto je v komplexu FOXO4-DBD:DNA tato vazba nepostradatelná. Z výsledků měření rezonance povrchového plasmonu dále vyplývá, že mutace v různých částech forkhead domény mají různý vliv na stabilitu komplexu FOXO4-DBD:DNA, všechny aminokyseliny esenciální pro vazbu DNA-vazebné domény FOXO4 na DNA se nacházejí buď v helixech H1 a H3 nebo v segmentu W2. Také bylo zjištěno, že vliv mutací na DNA-vazebnou afinitu je rozdílný v případě DNA obsahující IRE motiv a DNA obsahující DBE motiv. Tento jev lze vysvětlit jednak tím, že v komplexech FOXO4-DBD s DNA obsahující IRE motiv a DNA obsahující DBE motiv s velkou pravděpodobností existují odlišné kontakty, stejně jako tomu je v případě krystalových struktur FOXO1-DBD:DNA vyřešených pro IRE i DBE motiv (Brent *et al.*, 2008). Dalším faktorem budou i odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti obou studovaných DNA motivů, které pravděpodobně ovlivňují i konzervované interakce v oblasti s odlišnou sekvencí na 5' konci hlavního vazebného motivu.

## 7 ZÁVĚR

- Byly připraveny vektory nesoucí vybrané mutantní formy genu pro protein FOXO4-DBD.
- Byly exprimovány a purifikovány všechny vybrané mutantní proteiny FOXO4-DBD a WT.
- Byla porovnána vazebná afinita DBD transkripčního faktoru FOXO4 k různým dsDNA lišícím se v sekvenci předcházející hlavní vazebný motiv pomocí metody nativní elektroforézy. Bylo zjištěno, že tento metodický přístup neumožňuje spolehlivě porovnat vazebnou afinitu FOXO4-DBD k dsDNA, které se liší relativním zastoupením A-T vs. C-G párů.
- Byla porovnána vazebná afinita DBD transkripčního faktoru FOXO4 WT k různým dsDNA lišícím se v sekvenci předcházející hlavní vazebný motiv pomocí metody stacionární anizotropie fluorescence. Bylo zjištěno, že v případě vazby na DNA obsahující IRE motiv je DNA-vazebná afinita FOXO4-DBD výrazně vyšší k DNA s větším relativním zastoupením A-T vs. C-G párů v sekvenci předcházející hlavní vazebný motiv. V případě vazby FOXO4-DBD na DNA obsahující DBE motiv je efekt opačný a menší.
- Byla porovnána DNA-vazebná afinita proteinů FOXO4-DBD nesoucích vybrané bodové mutace pomocí metody rezonance povrchového plasmonu. Bylo zjištěno, že:
  - význam jednotlivých kontaktů v komplexu FOXO4-DBD:DNA se výrazně liší a že zrušení dokonce i jediného kontaktu mezi FOXO4-DBD a DNA může významně snížit jejich vzájemnou vazebnou afinitu
  - všechny aminokyseliny esenciální pro vazbu FOXO4-DBD na DNA se nacházejí buď v helixu H3 nebo v segmentu W2
  - vliv mutací na DNA-vazebnou afinitu je rozdílný v případě DNA obsahující IRE motiv a DNA obsahující DBE motiv.
- U vybraných mutantů FOXO4-DBD byla jejich DNA-vazebná afinita proteinů také porovnána metodou stacionární anizotropie fluorescence. Získaná data mají stejný trend jako data získaná metodou rezonance povrchového plasmonu.

## 8 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

1. Bois, P. R. J., Brochard, V. F., Salin-Cantegrel, A. V. A., Cleveland, J. L., Grosveld, G. C.: FoxO1a-cyclic GMP-dependent kinase I interactions orchestrate myoblast fusion. *Mol. Cell. Biol.*, 25, 7645–7656 (2005)
2. Boura, E., Rezaczkova, L., Brynda, J., Obsilova, V., Obsil, T.: Structure of the human FOXO4-DBD–DNA complex at 1.9 Å resolution reveals new details of FOXO binding to the DNA. *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 66, 1351–1357 (2010)
3. Boura, E., Silhan, J., Herman, P., Vecer, J., Sulc, M., Teisinger, J., Obsilova, V., Obsil, T.: Both the N-terminal loop and wing W2 of the forkhead domain of transcription factor Foxo4 are important for DNA binding. *J. Biol. Chem.*, 282, 8265–8275 (2007)
4. Brent, M. M., Anand, R., Marmorstein, R.: Structural basis for DNA recognition by FoxO1 and its regulation by posttranslational modification. *Structure*, 16, 1407–1416 (2008)
5. Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., Greenberg, M. E.: Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 96, 857–868 (1999)
6. Burgering, B. M. T.: A brief introduction to FOXOlogy. *Oncogene*, 27, 2258–2262 (2008)
7. Calnan, D. R., Brunet, A.: The FoxO code. *Oncogene*, 27, 2276–2288 (2008)
8. Carlsson, P., Mahlapuu, M.: Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. *Dev. Biol.*, 250, 1–23 (2002)
9. Clark, K. L., Halay, E. D., Lai, E., Burley, S. K.: Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature*, 364, 412–420 (1993)
10. Cooper, G. M.: *The Cell: A Molecular Approach, 2nd edition*, Sinauer Associates, Sunderland (2000)
11. Daitoku, H., Hatta, M., Matsuzaki, H., Aratani, S., Ohshima, T., Miyagishi, M., Nakajima, T., Fukamizu, A.: Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101, 10042–10047 (2004)

12. Fukuoka, M., Daitoku, H., Hatta, M., Matsuzaki, H., Umemura, S., Fukamizu, A.: Negative regulation of forkhead transcription factor AFX (Foxo4) by CBP-induced acetylation. *Int. J. Mol. Med.*, 12, 503–508 (2003)
13. Furuyama, T., Nakazawa, T., Nakano, I., Mori, N.: Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem. J.*, 349, 629–634 (2000)
14. Galili, N., Davis, R. J., Fredericks, W. J., Mukhopadhyay, S., Rauscher 3rd, F. J., Emanuel, B. S., Rovera, G., Barr, F. G.: Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat. Genet.*, 5, 230–235 (1993)
15. Greer, E. L., Brunet, A.: FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*, 24, 7410–7425 (2005)
16. Hribal, M. L., Nakae, J., Kitamura, T., John R. Shutter, J. R., Accili, D.: Regulation of insulin-like growth factor–dependent myoblast differentiation by Foxo forkhead transcription factors. *J. Cell Biol.*, 162, 535–541 (2003)
17. Huang, H., Regan, K. M., Lou, Z., Chen, J., Tindall, D. J.: CDK2-dependent phosphorylation of FOXO1 as an apoptotic response to DNA damage. *Science*, 314, 294–297 (2006)
18. 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.*, 278, 35959–35967 (2003)
19. Jin, C., Liao, X.: Backbone dynamics of a winged helix protein and its DNA complex at different temperatures: changes of internal motions in genesis upon binding to DNA. *J. Mol. Biol.*, 292, 641–651 (1999)
20. Jürgens, G., Weigel, D.: Terminal versus segmental development in the *Drosophila* embryo: the role of the homeotic gene *fork head*. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 197, 345–354 (1988)
21. Kaestner, K. H., Knöchel, W., Martínez, D. E.: Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev.*, 14, 142–146 (2000)
22. Kaufmann, E., Knöchel, W.: Five years on the wings of fork head. *Mech. Dev.*, 57, 3–20 (1996)
23. Kops, G. J. P. L., de Ruiter, N. D., De Vries-Smits, A. M. M., Powell, D. R., Bos, J. L., Burgering, B. M. T.: Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature*, 398, 630–634 (1999)

24. Lakowicz, J. R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd edition*, Springer, New York (2006)
25. Lehtinen, M. K., Yuan, Z., Boag, P. R., Yang, Y., Villén, J., Becker, E. B. E., DiBacco, S., de la Iglesia, N., Gygi, S., Blackwell, T. K., Bonni, A.: A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. *Cell*, 125, 987–1001 (2006)
26. Lin, K., Dorman, J. B., Rodan, A., Kenyon, C.: *daf-16*: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 278, 1319–1322 (1997)
27. Marsden, I., Jin, C., Liao, X.: Structural changes in the region directly adjacent to the DNA-binding helix highlight a possible mechanism to explain the observed changes in the sequence-specific binding of winged helix proteins. *J. Mol. Biol.*, 278, 293–299 (1998)
28. Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Aoyama, H., Yoshimochi, K., Fukamizu, A.: Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 11278–11283 (2005)
29. Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P. M., Shaw, A. S.: Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*, 84, 889–897 (1996)
30. Nakae, J., Kitamura, T., Kitamura, Y., Biggs 3rd, W. H., Arden, K. C., Accili, D.: The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev. Cell*, 4, 119–129 (2003)
31. O'Brien, R. M.; Granner, D. K.: Regulation of gene expression by insulin. *Physiol. Rev.*, 76, 1109–1161 (1996)
32. Obsil, T., Obsilova, V.: Structural basis for DNA recognition by FOXO proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1813, 1946–1953 (2011)
33. Obsil, T., Obsilová, V.: Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. *Oncogene*, 27, 2263–2275 (2008)
34. Overdier, D. G., Porcella, A., Costa, R. H.: The DNA-binding specificity of the hepatocyte nuclear factor 3/forkhead domain is influenced by amino-acid residues adjacent to the recognition helix. *Mol. Cell. Biol.*, 14, 2755–2766 (1994)

35. Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C. J., Yoon, J. C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D., Spiegelman, B. M.: Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 $\alpha$  interaction. *Nature*, 423, 550–555 (2003)
36. Reddy, Ch. K., Das, A., Jayaram, B.: Do water molecules mediate protein-DNA recognition? *J. Mol. Biol.*, 314, 619–632 (2001)
37. Rohs, R., Jin, X., West, S. M., Joshi, R., Honig, B., Mann, R. S.: Origins of specificity in protein-DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.*, 79, 233–269 (2010)
38. Sheng, W., Rance, M., Liao, X.: Structure comparison of two conserved HNF-3/fkh proteins HFH-1 and HNF-3 indicates the existence of folding differences in their complexes with a DNA binding sequence. *Biochemistry*, 41, 3286–3293 (2002)
39. Stroud, J. C., Wu, Y., Bates, D. L., Han, A., Nowick, K., Paabo, S., Tong, H., Chen, L.: Structure of the forkhead domain of FOXP2 bound to DNA. *Structure*, 14, 159–166 (2006)
40. Tsai, K. L., Huang, C. Y., Chang, C. H., Sun, Y. J., Chuang, W. J., Hsiao, C. D.: Crystal structure of the human FOXK1 $\alpha$ -DNA complex and its implications on the diverse binding specificity of winged helix/forkhead proteins. *J. Biol. Chem.*, 281, 17400–17409 (2006)
41. Tsai, K. L., Sun, Y. J., Huang, C. Y., Yang, J. Y., Hung, M. C., Hsiao, C. D.: Crystal structure of the human FOXO3 $\alpha$ -DBD/DNA complex suggests the effects of post-translational modification. *Nucleic Acids Res.*, 35, 6984–6994 (2007)
42. van Dongen, M. J., Cederberg, A., Carlsson, P., Enerback, S., Wikstrom, M.: Solution structure and dynamics of the DNA-binding domain of the adipocyte-transcription factor FREAC-11. *J. Mol. Biol.*, 296, 351–359 (2000)
43. Weigel, D., Jäckle, H.: The *fork head* domain: a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors? *Cell*, 63, 455–456 (1990)
44. 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*, 40, 5861–5869 (2001)
45. Zheng, N., Fraenkel, E., Pabo, C. O., Pavletich, N. P.: Structural basis of DNA recognition by the heterodimeric cell cycle transcription factor E2F–DP. *Genes Dev.*, 13, 666–674 (1999)