

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Přírodovědecká fakulta

**Katedra biochemie**

---



**PŘÍPRAVA DNA-VAZEBNÉ DOMÉNY FORKHEAD  
TRANSKRIPČNÍHO FAKTORU FOXO3**

PREPARATION OF DNA-BINDING DOMAIN OF FORKHEAD  
TRANSCRIPTION FACTOR FOXO3

**Bakalářská práce**

studijního oboru Biochemie

**Školitel-specialista: RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.**

**Vedoucí práce: doc. RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D.**

**Praha 2014**

**Vojtěch Dolejš**

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitelky RNDr. Veroniky Obšilové, Ph.D. a že jsem všechny použité prameny řádně citoval. Tato práce nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne .....

.....

Podpis

## Poděkování

Děkuji své školitelce RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D. za trpělivé vedení práce v laboratoři, odborné rady a pomoc při vypracování této práce.

Dále děkuji doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi, PhD. za roli garanta a RNDr. Zdeňku Tošnerovi, Ph.D. za provedení NMR experimentů.

Děkuji Mgr. Miroslavě Kopecké za pomoc v laboratoři, celému kolektivu pracovní skupiny Proteinových struktur na Fyziologickém ústavu AV ČR, v.v.i. za přátelské prostředí v laboratoři a doc. RNDr. Tomáši Obšilovi, PhD. za informace získané během laboratorních seminářů.

Děkuji svým rodičům za poskytnuté zázemí a podporu.

## ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je součástí projektu, jehož cílem je vývoj nízkomolekulárních látek schopných inhibovat interakci lidského transkripčního faktoru FOXO3 s DNA. Hlavním cílem této bakalářské práce je příprava  $^{15}\text{N}$  značené DNA-vazebné domény proteinu FOXO3 (FOXO3-DBD) a ověření její nativní struktury pomocí  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC NMR experimentu.

Transkripční faktory FOXO jsou důležité a evolučně konzervované regulační proteiny, které se účastní mnoha důležitých buněčných dějů. Aktivita FOXO proteinů je regulována posttranslačními úpravami, z nichž nejdůležitější jsou fosforylace, acetylace a ubikvitinace. Forkhead transkripční faktory zastávají značný počet různých buněčných funkcí, ovšem jejich exprese může probíhat pouze v některých typech tkání. Obsahují asi 100 aminokyselin dlouhou DNA-vazebnou doménu složenou z několika částí. Mezi jejich funkce patří regulace buněčného cyklu a apoptózy, proliferace a diferenciaci buněk, kontrola metabolismu a regulace protistresové odpovědi. U některých typů nádorových buněk je resistence vůči chemoterapii zprostředkována právě vysokou aktivitou transkripčního faktoru FOXO3. Z tohoto důvodu je nutné hledat způsoby, jak cíleně potlačit funkci tohoto proteinu.

### **Klíčová slova**

FOXO3, exprese, purifikace, NMR

## ABSTRACT

This bachelor thesis is part of a project aiming for the development of low molecular compounds which would be capable to inhibit the interaction between human transcription factor FOXO3 and DNA. Main goal of this thesis is preparation of  $^{15}\text{N}$ -labelled DNA-binding domain of FOXO3 protein (FOXO3-DBD) and verification of its native structure using  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC NMR experiment.

FOXO transcription factors are important and evolutionary conserved regulatory proteins, which are involved in many crucial cellular processes. The activity of FOXO proteins is regulated by posttranslational modifications, out of which the most important are phosphorylation, acetylation and ubiquitination. Forkhead transcription factors participate in a variety of different cellular functions, although its expression is limited to specific tissues. They contain approximately 100 amino acids long DNA-binding domain composed of several parts. Among its main functions belong the regulation of cell cycle and apoptosis, proliferation and cell differentiation, metabolism control and stress-response regulation. Some types of tumor cells have developed resistance against chemotherapy by increasing activity of FOXO3 transcription factors. For this reason, it is necessary to look for means to specifically suppress the function of this protein.

This thesis is written in Czech.

### Key words

FOXO3, expression, purification, NMR

# OBSAH

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Obsah.....	6
Seznam použitých zkratk.....	7
<b>1 Teoretický úvod.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1</b> Transkripce a transkripční faktory.....	<b>8</b>
<b>1.2</b> Forkhead transkripční faktory a podrodina FOXO.....	<b>9</b>
<b>1.3</b> Struktura proteinů podrodiny FOXO.....	<b>10</b>
<b>1.4</b> Mechanismus vazby na DNA.....	<b>11</b>
<b>1.5</b> Funkce FOXO3.....	<b>12</b>
<b>1.6</b> Regulace působení FOXO.....	<b>12</b>
<b>2 Cíle práce.....</b>	<b>16</b>
<b>3 Materiály a metody.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1</b> Použitý materiál.....	<b>17</b>
<b>3.1.1</b> Chemikálie.....	<b>17</b>
<b>3.1.2</b> Přístroje.....	<b>18</b>
<b>3.1.3</b> Laboratorní pomůcky.....	<b>18</b>
<b>3.2</b> Exprese FOXO3-DBD.....	<b>19</b>
<b>3.2.1</b> Exprese v LB médiu.....	<b>19</b>
<b>3.2.2</b> Exprese v minimálním médiu.....	<b>19</b>
<b>3.2.3</b> Centrifugace a lyze buněk.....	<b>20</b>
<b>3.3</b> Purifikace FOXO3-DBD.....	<b>21</b>
<b>3.3.1</b> Sonikace.....	<b>21</b>
<b>3.3.2</b> Ni chelatační chromatografie.....	<b>21</b>
<b>3.3.3</b> Dialýza.....	<b>22</b>
<b>3.3.4</b> Kationtově výměnná chromatografie.....	<b>23</b>
<b>3.3.5</b> Gelová permeační chromatografie.....	<b>24</b>
<b>3.3.6</b> Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS.....	<b>25</b>
<b>3.3.7</b> Nukleární magnetická rezonance.....	<b>28</b>
<b>4 Výsledky.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1</b> Purifikace FOXO3-DBD.....	<b>30</b>
<b>4.1.1</b> První purifikace z LB média.....	<b>30</b>
<b>4.1.2</b> Druhá purifikace z LB média.....	<b>32</b>
<b>4.1.3</b> Purifikace z minimálního média.....	<b>34</b>
<b>4.1.4</b> Purifikace ze značeného minimálního média.....	<b>36</b>
<b>4.2</b> Nukleární magnetická rezonance.....	<b>39</b>
<b>5 Diskuse.....</b>	<b>40</b>
<b>6 Závěr.....</b>	<b>41</b>
<b>7 Seznam citované literatury.....</b>	<b>42</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	adenin
APS	peroxodisíran amonný ( z angl. ammonium peroxodisulphate)
C	cytosin
CBB R250	Coomasie Brilliant Blue R250, modré barvivo
DBD	DNA-vazebná doména (z angl. DNA-binding domain)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
DTT	1,4-dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
FOXO	forkhead box O, O-podskupina forkhead transkripčních faktorů
FKH	forkhead doména
G	guanin
GST	glutathion-S-transferasa
FPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie (z angl. fast protein liquid chromatography)
IGF-1	insulinu podobný růstový faktor (z angl. insulin-like growth factor)
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
LB	živné médium (médium dle Luria-Bertaniho)
NES	nukleární exportní sekvence
NLS	nukleární lokalizační signál
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (z angl. polyacrylamide gel electrophoresis)
PBS	fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)
PKB/Akt	proteinkinasa B
PP	precision proteasa
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
RPM	otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
SDS	dodecylsírán sodný, denaturační činidlo (z angl. sodium dodecylsulphate)
SGK	kinasa (z angl. serum- and glucocorticoid-inducible kinase)
T	thymin
TA	transaktivační doména
TEMED	N, N, N', N'-tetraethylendiamin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	jednotka (z angl. unit)
v/v	objem/objem (z angl. volume/volume)
w/v	hmotnost/objem (z angl. weight/volume)

# **1 PŘEHLED LITERATURY**

## **1.1 Transkripce a transkripční faktory**

Transkripce je proces, při kterém se překládá genetická informace z deoxyribonukleové kyseliny (DNA) do ribonukleové kyseliny (RNA). RNA se pak dále upravuje, transportuje z jádra do cytoplasmy a je dále překládána do formy proteinu. Celému tomuto procesu se pak souhrnně říká buněčná exprese. RNA má jiné složení než DNA, proto jsou k transkripci potřeba jiné enzymy než k prosté replikaci DNA. Hlavním rozdílem ve složení je cukerná složka, DNA obsahuje 2'-deoxyribosu, RNA ribosu. Rozdíl ve výskytu bází není tak podstatný, protože se může stát, že se vyskytne nestandardní báze jak v DNA, tak v RNA.

K započetí překladu z DNA do RNA je nutné, aby byla DNA dostupná pro RNA polymerasu, čehož se dosahuje složitým systémem transkripčních faktorů. Celý proces transkripce je rozdělen na tři úseky, iniciaci, elongaci a terminaci. Během iniciace dochází k rozpoznání promotoru transkripčními faktory, které se váží na dvoušroubovici DNA a mění její konformaci. U eukaryot je promotorem sekvence TATAAA, nazývaná TATAbox, která se vyskytuje asi 25 párů bází před samotným počátkem genu. Mnohá eukaryota mají další regulační sekvence, jako je CAATbox a enhancerové sekvence, vzdálené mnohdy i několik tisíc párů bází od počátku genu. Do této struktury transkripčních faktorů navázaných na promotorovou sekvenci DNA se může navázat RNA polymerasa II a přepsat kódující vlákno DNA do RNA, která je dále překládána do proteinů.<sup>[1,2]</sup>

Pro transkripci všech genů jsou potřeba obecné transkripční faktory, pro jednotlivé geny pak mohou existovat specifické regulační transkripční faktory. Mezi obecné transkripční faktory patří aktivátory a mediátory. Aktivátory spouští transkripci po navázání všech složek transkripčního aparátu a mediátory zprostředkovávají vazbu tohoto komplexu s enzymy zpracovávajícími kondenzovaný chromatin do formy jemu přístupné. Obecné transkripční faktory si jsou vzájemně velmi podobné napříč všemi eukaryotickými organismy.<sup>[1,2]</sup>



## 1.2 Forkhead transkripční faktory a podrodina FOXO

Forkhead transkripční faktory jsou skupina strukturně podobných aktivátorů transkripce. Byly nalezeny u mnoha eukaryotických organismů, od těch nejjednodušších až po člověka. Jsou podskupinou, nazývanou v anglické literatuře „winged helix proteins“, třídy proteinů interagujících s DNA označovaných jako „helix-turn-helix“ proteiny. Tyto proteiny se vyskytují u prokaryot i eukaryot. Název forkhead je odvozen od prvního objeveného genu této skupiny, který je důležitý pro správný vývoj embryí *Drosophil*.<sup>[3,4]</sup> Tento Forkhead gen je zodpovědný za vytvoření růstové hranice, aby se embryo vyvinulo ve fyziologicky správně poskládaného jedince. Postupně bylo objeveno mnoho proteinů této skupiny, a byly rozděleny do podrodin s kódovým označením FOX a písmeno abecedy, např. FOXO. Existují podrodiny A až S a proteiny se do nich řadí na základě homologie primární struktury proteinů.<sup>[5,6]</sup>

Podrodina FOXO, tedy forkhead box O transkripční faktory, se podílí hlavně na procesech souvisejících s regulací buněčného cyklu, buněčné smrti, oprav DNA a odpovědí na oxidační stres.<sup>[7]</sup> Rozmanitost regulátorů a efektů těchto proteinů napovídá, že jejich funkcí je udržovat homeostázi tkání v čase a koordinovat odpověď na změny prostředí, oxidační a metabolický stres nebo nedostatek růstových faktorů.<sup>[8]</sup> Jejich funkce je kontrolována sérií protein-proteinových interakcí, při kterých dochází k posttranslačním modifikacím, hlavně fosforylaci, acetylaci a ubikvitinaci. FOXO proteiny již byly identifikovány v mnoha organismech, jmenovitě např. modelové organismy *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, ale i jiných.<sup>[9]</sup> Než došlo ke sjednocení názvosloví těchto proteinů, používaly se mnohé názvy, např. FKHRL1 pro FOXO3. Kódové označení FOX se používá pouze pro proteiny nalezené u obratlovců, u bezobratlých mají vlastní názvy, i když jsou sekvenčně podobné a zastávají stejnou nebo velmi podobnou funkci.<sup>[10]</sup>

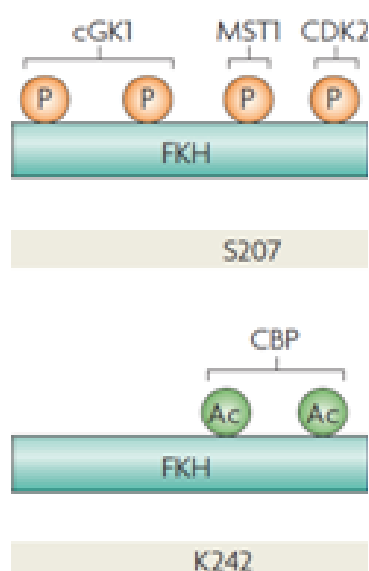
Čtyři členové podrodiny FOXO mají stejnou funkci, ale liší se v detailech své struktury a místem exprese. FOXO1 je exprimován převážně v tukové tkáni, FOXO3 v játrech, FOXO4 ve svalové tkáni a FOXO6 pouze v mozku.<sup>[7]</sup>

### 1.3 Struktura proteinů podrodiny FOXO

Všechny FOXO proteiny mají stejnou doménovou organizaci primární struktury a obsahují forkhead DNA-vazebnou doménu, jaderný lokalizační signál, sekvenci důležitou pro export z jádra a transaktivační doménu. Tyto domény jsou u všech proteinů podrodiny FOXO strukturně velmi podobné.<sup>[6]</sup> Na Obr. 1.1 jsou schematicky znázorněny posttranslační úpravy FOXO3. Aminokyselinová sekvence proteinu FOXO3, která je uložena v databázi UniProt<sup>[11]</sup> pod kódem O43524, je uvedena níže. Tato práce se zabývá pouze úsekem DNA-vazebné domény, který je vyznačen červenými písmeny.

#### Sekvence FOXO3 s vyznačeným úsekem DNA-vazebné domény

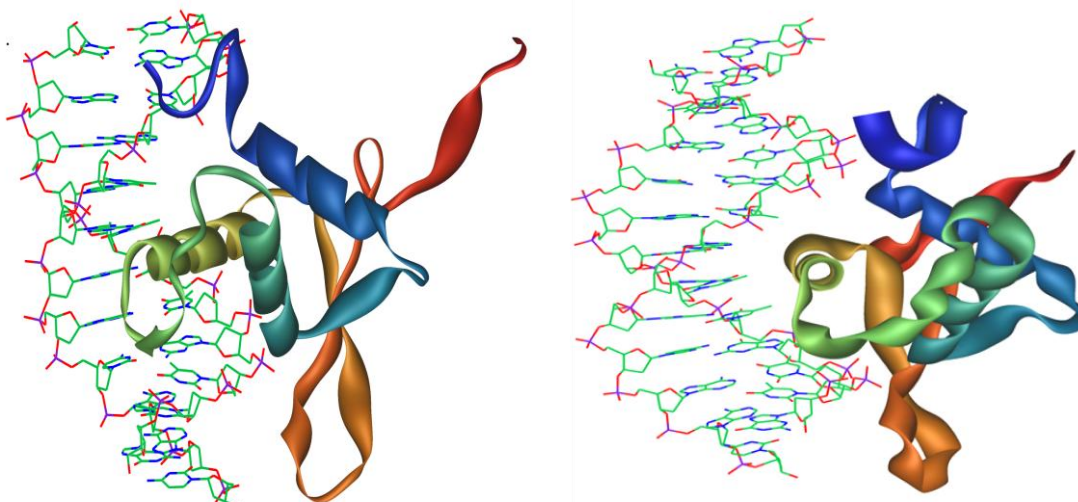
MAEAPASPAPLSPLEVELDPEFEPQSRPRSCTWPLQRPELQASPAKPSGETAADSMIPEEEDDEDGGRAGS  
AMAIGGGGGSGTLGSLLEDARSVLAPGGQDPGSGPATAAGGLSGGTQALLQPQQPLPPPQGAAGGSGQPR  
KCSSRRN**AWGNLSYADLITRAIESSDPKRLTLSQIYEMVRCVPYFKDKGDSNSSAGWKNSIRHNLSLHSRFMR**  
**VQNEGTGKSSWWIINPDGGKSGKAPRRRAVSMDNSNKYTKSRGRAAKKKAALQTAPESADDSPSQLSKWPGS**  
PTSRSSDELDAWTDFRSRTNSNASTVSGRLSPIMASTELDEVQDDDAPLSPMLYSSASLSPSVSKPCTVELPRLT  
DMAGTMNLNDGLTENLMDLLDNITLPPSQPSPTGGLMQRSSSFYTTKSGGLGSPTSSFNSTVFGPSSLNSLRQ  
SPMQTIQENKPATFSSMSHYGNQTLQDLLTSDSLSHSDVMMTQSDPLMSQASTAVSAQNSRRNVMLRNDPMM  
SFAAQPNQGSVLNQNLLHHQHQTQALGGSRALNSVSNMGLSESSSLGSAKHQQSPVQSMTLSDSLSGSS  
LYTSANLPVMGHEKFPDLDLDMFNGLSLECDMESIIRSELMDADGLDFNFDLISTQNVVGLNVGNFTGAKQA  
SSQSWVPG



Obr. 1.1: Schématické znázornění posttranslačních úprav FOXO3. Převzato a upraveno z článku.<sup>[12]</sup>

FKH-forkhead doména (DNA-vazebná doména), P-fosfátová skupina, cGK1-cGMP dependentní proteinkinasa 1, MST1-proteinkinasa z rodiny STE20, CKD2-cyklin dependentní kinasa 2, Ac-acetátová skupina, CBP-cAMP response element binding (CREB) vazebný protein.

## 1.4 Mechanismus vazby na DNA



Obr. 1.2: FOXO3 navázaný ve velkém žlábkú dvoušroubovice DNA. Na tomto obrázku je dobře vidět interakce helixu H3 (oranžově) s DNA.<sup>[13]</sup>

Forkhead DNA-vazebná doména se skládá z asi 110 aminokyselin uspořádaných do tří  $\alpha$ -helixů (H1, H2 a H3), tří  $\beta$ -listů (S1, S2 a S3) a dvou spojovacích ohybů ve tvaru křídel (winged-like loops, W1 a W2). Domény jsou v prostoru uspořádány v pořadí H1-S1-H2-H3-S2-W1-S3-W2. List S1 je vložen mezi helixy H1 a H2 a tvoří tak suprasekundární strukturu  $\alpha\beta$ . Současně interaguje s listy S2 a S3, čímž vytváří antiparalelní  $\beta$ -skládanou strukturu. Na obrázku 1.2 je vidět lidský FOXO3 protein navázaný na dvoušroubovici DNA. Hlavním DNA-vazebným elementem je helix H3, který se vkládá do velkého žlabu DNA v rovině téměř kolmé na strukturu dvoušroubovice a tvoří velkou část specifických interakcí mezi DNA a FOXO proteinem.<sup>[14]</sup>

Interakce FOXO proteinů s DNA je umožněna jejich DNA-vazebnou doménou. FOX proteiny obecně rozpoznávají sekvenci 5'-(A/C)AA(C/T)A-3'. Forkhead DNA-vazebná doména FOXO proteinů specificky rozpoznává úsek 5'-GTAAACAA-3', přičemž vazba je zprostředkována helixem H3, který se váže do velkého žlabku. Navíc je vazba umožněna změnami v hydratačním obalu obou vazebných partnerů a vytvořením unikátního uspořádání molekul vody.<sup>[15]</sup> Kromě toho se vazby účastní také hydrofobní efekt a van der Waalsovské interakce.<sup>[16]</sup> Kromě helixu H3 s DNA mohou interagovat ještě ohyby W1 a W2 a N-konec forkhead domény. Tyto části interagují elektrostaticky s fosfátovými skupinami kostry DNA. Vazba FOXO3 na DNA vyvolává velkou změnu ve

strukturu DNA, zatímco protein samotný si svou strukturu uchovává téměř nezměněnou. Přesný mechanismus specifické vazby forkhead proteinů na DNA není stále objasněn, předpokládá se však, že jsou za ní zodpovědné rozdílné distribuce náboje v DNA-vazebných doménách různých FOX proteinů.<sup>[17]</sup>

### 1.5 Funkce FOXO3

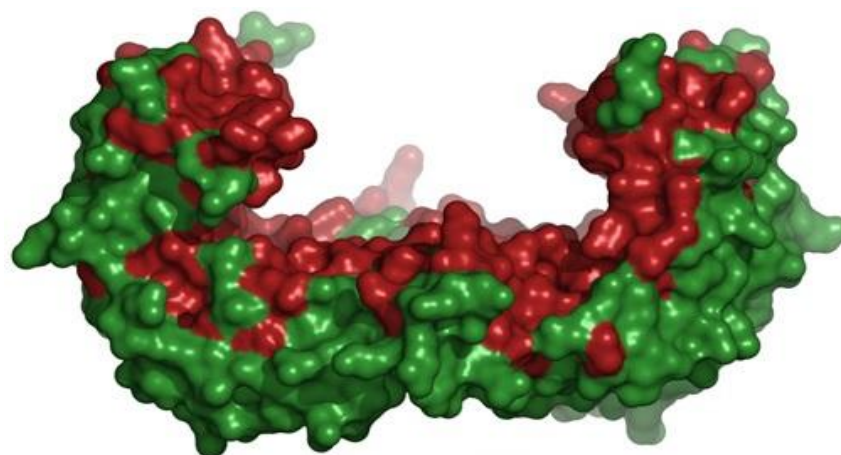
FOXO proteiny jsou důležité regulační proteiny zasahující do mnoha buněčných dějů. FOXO3 je exprimován hlavně v jaterní tkáni, kde se aktivně účastní odpovědi na oxidační stres. V játrech během metabolismu nejrůznějších látek vznikají nebezpečné kyslíkové radikály, které musí být odstraněny. Kyslíkové radikály jsou zodpovědné za poškozování buněčných struktur, poškozování genetické informace a tím způsobené nemoci či zrychlení procesu stárnutí.<sup>[18]</sup> Zvýšený oxidační stres je aktivátorem mnoha posttranslačních modifikací FOXO proteinů, jako například již zmíněné fosforylace, acetylace a ubikvitinace. Takto upravené FOXO proteiny působí svou aktivitou proti oxidačnímu stresu indukci transkripce genů s ochranným účinkem.<sup>[12]</sup>

### 1.6 Regulace působení FOXO

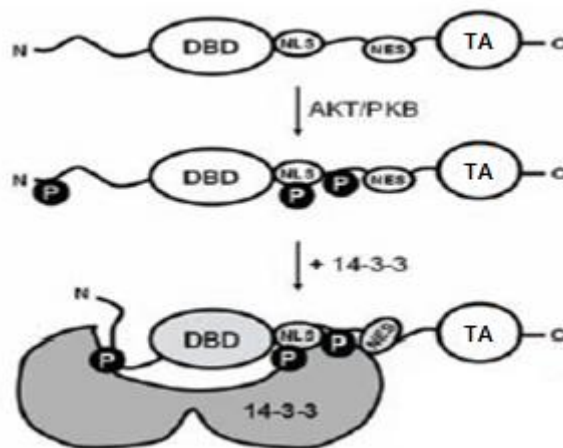
FOXO proteiny jsou regulovány posttranslačními úpravami, ke kterým dochází v různých kompartmentech buňky a tak určují jeho buněčnou lokalizaci a funkční roli. Při změně posttranslačních úprav dochází k translokaci FOXO proteinu do jiného buněčného kompartmentu, čímž se zajišťuje jeho správná funkčnost. Posttranslační úpravy buď přímo mění konformaci FOXO proteinu, nebo odkrývají a zakrývají specifická vazebná místa pro interakční partnery. Posttranslační úpravy jsou regulovány vnějším signálem. Mezi faktory ovlivňující způsob posttranslačních modifikací FOXO proteinů patří například insulin, insulinu podobný růstový faktor 1 (IGF-1, z anglického insulin-like growth factor 1), jiné růstové faktory, některé cytokiny, některé živiny, neurotrofní faktory a oxidační stres.<sup>[7]</sup>

Nejběžnější posttranslační úpravou FOXO proteinů je fosforylace. Fosforylace je realizována kinasami PKB/Akt a SGK a působí negativně. Tyto kiny jsou součástí signální dráhy PI3K-PKB/Akt, která odpovídá na přítomnost insulinu, IGF-1, růstových a neurotrofních faktorů. Reakcí s těmito kinasami se připojí fosfátová skupina na první a

druhé fosforylační místo: Thr32 a Ser254. Vytvoří se tak vazebné místo pro regulační protein 14-3-3, který se vyskytuje v jádře a po vazbě na FOXO proteiny značně urychluje jejich aktivní transport z jádra ven. V jádře tedy klesá koncentrace FOXO proteinů a snižuje se tím pravděpodobnost, že aktivují nějaký gen. Protein 14-3-3 také značně maskuje jaderný lokalizační signál ve struktuře FOXO proteinů a tím jim zabraňuje se okamžitě vrátit zpět do jádra. V cytoplasmě se tedy nachází velké množství fosforylovaných FOXO proteinů zadržovaných proteiny 14-3-3, které čekají na svou aktivaci. Aktivace probíhá pomocí odštěpení fosfátů a disociace proteinu 14-3-3. Tento proces není příliš prozkoumán, lze pouze říci, že za defosforylaci jsou zodpovědné proteinfosfatasy.<sup>[19]</sup> Proteiny 14-3-3 jsou regulační proteiny, které se vyskytují u všech zkoumaných eukaryotických organismů. Jejich regulační funkce spočívá v ovlivnění struktury a blokování vazebných míst interakčních partnerů, kterých je celá řada. Fungují jako dimery a mají mnoho isoform, jen u člověka je jich známo nejméně sedm. I přes tyto vlastnosti jsou ale vysoce konzervované a sekvenčně podobné napříč celou eukaryotickou říší. Dimerizací se vytváří kanál (obrázek 1.3), který obsahuje nejkonzervovanější aminokyseliny a umožňuje navázání a upevnění celé řady interakčních partnerů pomocí slabých vazebných interakcí. FOXO proteiny jsou pouze jedním z mnoha typů interakčních partnerů. Jak je vidět na obrázku 1.4 (str. 14), fosforylační místa blízké sousedí s DNA-vazebnou doménou a tím zabraňují vazbě FOXO-DBD na DNA, když je FOXO vázán na protein 14-3-3.<sup>[14]</sup>



Obr. 1.3: Struktura lidské isoformy proteinu 14-3-3 $\zeta$  (povrchová reprezentace). Aminokyselinové zbytky konzervované u všech lidských isoform jsou znázorněny červeně. Převzato a upraveno z článku.<sup>[20]</sup>



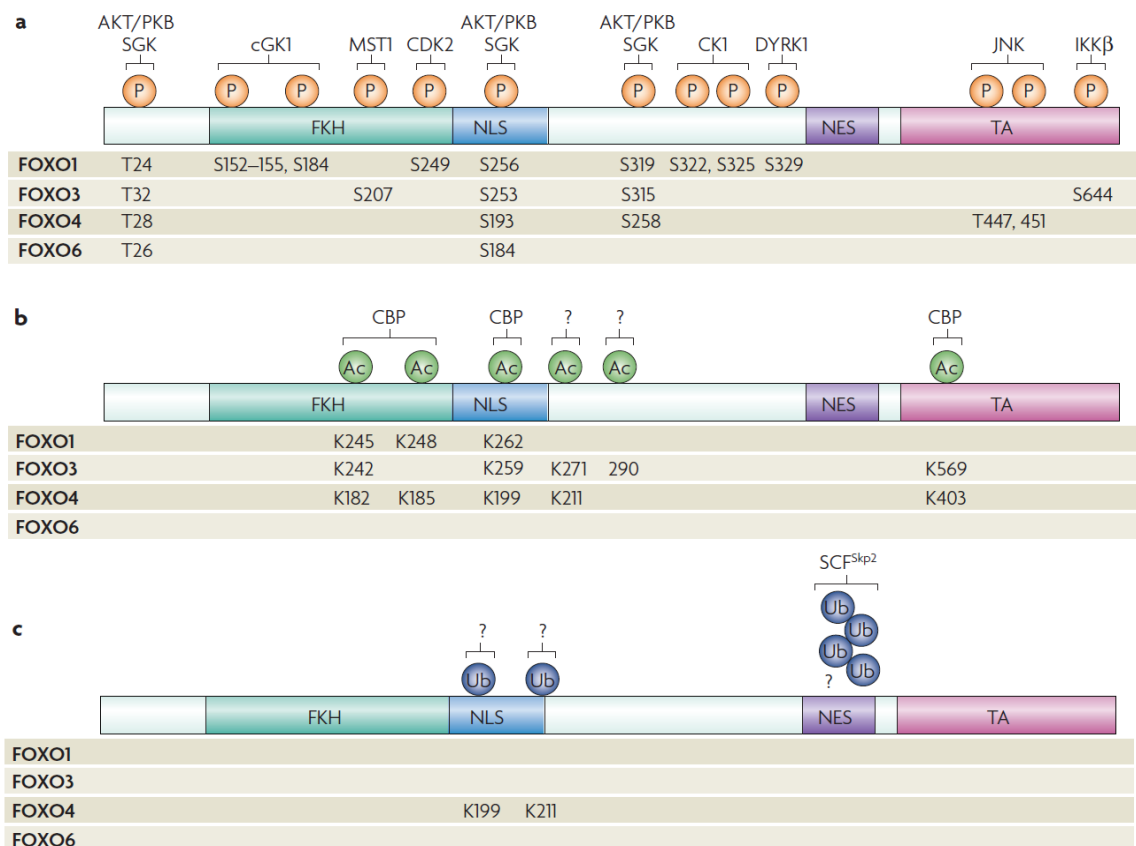
Obr. 1.4: Schématické znázornění vazby proteinu 14-3-3 na FOXO. Na obrázku je dobře vidět, že DNA-vazebná doména (DBD) je uchycena v kanálu 14-3-3 dimeru (pomocí fosforylovaných serinů v polohách 256 a 319 a tyrosinu v poloze 24) čímž je stericky bráněno vazbě na DNA.<sup>[14]</sup> NLS-nukleární lokalizační signál, NES- nukleární exportní sekvence, TA-transaktivační doména, P-fosfátová skupina, AKT/PKB-kinasa

Bylo zdokumentováno, že FOXO mohou do jádra vstupovat i bez defosforylace na místech zodpovědných za vazbu na 14-3-3, a to v případě, že je buňka podrobena oxidačnímu stresu. Při těchto podmínkách je totiž fosforylováno další místo proteinkinasou MST1, umístěné v DNA-vazebné doméně (jde o Ser207). Je-li tento serin fosforylován, přeruší se vazba s 14-3-3 proteinem a FOXO protein je aktivně transportován do jádra. Existuje ještě jedna stresem aktivovaná proteinkinasa fosforylující FOXO proteiny, JNK. Tato fosforylace probíhá mimo DNA-vazebnou doménu na Thr447 a zároveň na povrchu 14-3-3 proteinu, čímž se také docílí přerušení vazby FOXO proteinu na 14-3-3.<sup>[19,21]</sup>

Další možností posttranslačních úprav je ubiquitinace. U proteinu FOXO4 spouští ubiquitinace transport do jádra a následuje transkripce, která bez ubiquitinace neprobíhá. Ubikvitin je malý evolučně konzervovaný protein, který se používá jako buněčná značka, která svojí vazbou označí proteiny, jež jsou určeny k proteolytické likvidaci. Ke spuštění proteolýzy musí být protein ubiquitinován více než jednou, proto se dá monoubikvitinace použít jako signál, který svého nositele neodsoudí k okamžitému zániku. V případě FOXO proteinů se monoubikvitinace používá jako jaderný lokalizační signál a nastává jako odpověď na oxidační stres.<sup>[22]</sup>

Poslední prozkoumanou posttranslační úpravou je acetylace. Acetylace je řízena oxidačním stresem a určuje lokalizaci FOXO proteinů. Acetylované FOXO proteiny jsou přesouvány do oblastí jádra s vysokou koncentrací FOXO-regulujících proteinů.<sup>[19]</sup>

Na obrázku 1.5 je grafické znázornění všech pozorovaných posttranslačních úprav FOXO proteinů. Obrázek je přejet z článku a upraven.<sup>[12]</sup>



Obr. 1.5: Schématické znázornění posttranslačních úprav různých isoformů proteinů podrodiny FOXO.<sup>[12]</sup> Proteiny z třídy O transkripčních faktorů FOX obsahují následující čtyři domény: FKH, NLS, NES a TA; kde FKH je forkhead doména neboli DNA-vazebná doména, NLS-nukleární lokalizační signál, NES- nukleární exportní sekvence, TA-transaktivací doména, P-fosfátová skupina, Ac-acetátová skupina, Ub-ubikvitin

## 2 CÍLE PRÁCE

- 1.) Osvojení si exprese a purifikace DNA-vazebné domény lidského forkhead transkripčního faktoru FOXO3(FOXO3-DBD) v bakteriích *Escherichia coli*.
- 2.) Optimalizace purifikačního protokolu s cílem limitovat proteolytickou degradaci připravovaného proteinu.
- 3.) Expres a purifikace  $^{15}\text{N}$  značeného proteinu FOXO3-DBD.
- 4.) Příprava vzorku pro NMR měření a porovnání naměřeného  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektra se spektrem publikovaným v literatuře.



### 3 MATERIÁLY A METODY

#### 3.1 Použitý materiál

##### 3.1.1 Chemikálie

Následující seznam chemikálií je seřazen abecedně, je uvedeno jméno výrobce.

β-merkptoethanol.....	Carl Roth
ampicilin.....	Sigma-Aldrich
azid sodný.....	Sigma-Aldrich
bromfenolová modř.....	Sigma-Aldrich
citrát sodný.....	PENTA
Coomassie Brilliant Blue R 250, CBB R250.....	SIGMA
dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného.....	PENTA
dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného.....	PENTA
dihydrogenfosforečnan draselný.....	PENTA
1,4-dithiothreitol, DTT.....	Carl Roth
dodecylsulfát sodný, SDS.....	Sigma-Aldrich
ethanol.....	PENTA
ethylendiamintetraoctová kyselina, EDTA.....	Carl Roth
fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF).....	Carl Roth
glukosa.....	PENTA
glycerol.....	LACH:NER
hydroxid draselný.....	LACH:NER
hydroxid sodný.....	LACH:NER
chlorid amonný.....	PENTA
chlorid draselný.....	LACH:NER
chlorid sodný.....	LACH:NER
chlorid vápenatý.....	LACH:NER
imidazol.....	Carl Roth
isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid, IPTG.....	Sigma-Aldrich
isopropanol.....	PENTA
kyselina chlorovodíková.....	LACH:NER
kyselina octová.....	LACH:NER
lysozym.....	Carl Roth
methanol.....	PENTA
médium Luria-Bertani, LB.....	Carl Roth
N, N, N', N'-tetraethylendiamin, TEMED.....	Carl Roth
persulfát amonný.....	Sigma-Aldrich
Prescission proteasa.....	vyrobena Dr. Obšilovou
Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA-Free.....	SIGMA
Rotiphorese Gel 30, směs akrylamidu a bisakrylamidu 37,5:1.....	Carl Roth
síran hořečnatý.....	LACH:NER

síran nikelnatý.....	PENTA
thiamin-hydrochlorid.....	Carl Roth
tris(hydroxymethyl)aminomethan, TRIS.....	Carl Roth

### 3.1.2 Přístroje

analytické váhy EG420-3NM.....	KERN
centrifuga 5804R.....	Eppendorf
centrifuga Z323K.....	HERMLE labortechnik
centrifuga Sigma 8K.....	SIGMA
FPLC Frac-900 a INV-907.....	Amersham Biosciences
inkubátor HT Multitron.....	Infors
magnetické míchačky VARIOMAG MAXI.....	Thermo Scientific
NMR spektrometr Avance III.....	Bruker
peristaltická pumpa Ecoline.....	Ismatec
pH metr JENWAY 3505.....	P-LAB
sada na elektroforézu.....	BioRad
sonikátor Sonicator3000 Misonix.....	Cole-Parmer
spektrofotometr Agilent 8453.....	Agilent Technologies
vortex Zx3.....	Velp Scientifica
vortex Vortex-GENIE2.....	Scientific Industries

### 3.1.3 Laboratorní pomůcky

automatické pipety.....	Eppendorf
centrifugační kyvety.....	Carl Roth
Color Burst standard na SDS-PAGE.....	BioRad
Chelating Sepharose Fast Flow.....	GE Healthcare
dialyzační membrána.....	Carl Roth
filtry SPARTAN13/0,45 RC.....	Whatman
kolona Superdex 75 (10/300GL).....	Amersham Biosciences
koncentrátory Amicon Ultra.....	Millipore
křemenné kyvety.....	Agilent Technologies
laboratorní sklo.....	Simax
mikrozkumavky.....	P-LAB
nylonové filtry.....	Whatman
SP sepharose.....	Amersham Biosciences
stříkačky.....	B. Braun
špičky.....	Axygen

## 3.2 Exprese FOXO3-DBD

### 3.2.1 Exprese v LB médiu

Z glycerolové konzervy bakterií *E. coli* BL21(DE3), obsahující gen pro FOXO3-DBD (aminokyseliny 156-275) v plasmidu pGEX-GP-1, bylo odebráno po 5  $\mu$ l do zkumavek s 5 ml tekutého LB média obsahujících ampicilin o koncentraci 100  $\mu$ g/ml. Byly připraveny tři dvoulitrové Erlenmayerovy báně, obsahující jeden litr sterilního LB média (tabulka 3.1). Do každé 2 l Erlenmayerovy báně byl přidán ampicilin tak, aby jeho koncentrace byla stejná jako v očkovacích médiích, tedy 100  $\mu$ g/ml a poté bylo přidáno 5 ml kultury z předchozího kroku. Erlenmayerovy báně byly inkubovány při 37°C za stálého třepání rychlostí 200 RPM, dokud se optická densita při vlnové délce 600 nm nerovná hodnotě 0,8, poměřováno s čistým médiem jako slepým vzorkem. V tuto chvíli byla teplota v inkubátoru snížena na 20°C a následovala indukce exprese proteinu FOXO3 přidáním 1 ml 0,5M IPTG (výsledná koncentrace tedy byla 0,5mM).

#### **Tabulka 3.1:**

LB médium:	1000 ml
trypton	10 g
NaCl	10 g
kvasinkový extrakt	5 g
H <sub>2</sub> O	doplňt do 1l

### 3.2.2 Exprese v minimálním médiu

Pracovní postup je stejný jako u exprese v LB médiu s tím rozdílem, že místo LB média je použito média minimální (tabulka 3.2, str. 20). Do jednoho litru tohoto média bylo přidáno 10 ml bakteriální kultury. Tuto bakteriální kulturu bylo předtím nutné opláchnout od původního LB média pomocí centrifugace (4000 $\times$ g, 3 min, 4°C) a trojitěho promytí vzorků v 5 ml minimálního média. Při expresi ve značeném médiu se použije <sup>15</sup>N značený chlorid amonný, jinak je postup stejný.

**Tabulka 3.2:**

Minimální médium:	1000 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
NaCl	0,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
doplněno deionizovanou vodou na 1 l, sterilizováno v autoklávu po vychlazení ještě přidány tyto roztoky, filtrované přes 0,22µm filtr:	
MgSO <sub>4</sub>	2 ml 1M roztoku
CaCl <sub>2</sub>	0,1 ml 1M roztoku
glukosa	4 g
thiamin-hydrochlorid	1 ml 1M roztoku

**3.2.3 Centrifugace a lyze buněk**

Kultury byly inkubovány při 20°C a 200 RPM 12 h. Bakteriální kultury byly přelity do jednolitrových kyvet, vyváženy a následně centrifugovány (4°C, 2600×g, 20 min). Pelet, ve kterém byly obsaženy bakterie, byl resuspendován ve vychlazeném lyzačním pufru (tabulka 3.3 a 3.4). Na resuspendaci peletu ze tří litrů bakteriální kultury bylo potřeba 100 ml lyzačního pufru. Resuspendovaný pelet byl zmrazen a uskladněn při teplotě -80°C.

**Tabulka 3.3:**

Lyzační pufr:	100ml
PBS 1×	10 ml 10×PBS (viz tabulka 3.4)
NaCl, výsledná koncentrace 1 M	5,84 g
imidazol, výsledná koncentrace 2 mM	0,0136 g
β-merkapt ethanol, výsledná koncentrace 4 mM	27,8 µl
doplněno deionizovanou vodou na 1 l	

**Tabulka 3.4:**

PBS 10×koncentrovaný	1000 ml
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 deionizovanou vodou na 1 l a pH upraveno na 7,4 pomocí 1M NaOH	

### **3.3 Purifikace FOXO3-DBD**

#### **3.3.1 Sonikace**

K rozmraženým peletám o celkovém objemu přibližně 100 ml byl přidán lysozym (výsledná koncentrace 0,1 mg/ml) a následovala inkubace za stálého míchání při 4°C po dobu 20 minut. Ke vzorku byl následně přidán 1 ml roztoku inhibitorů proteas SIGMAFAST Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA-Free (1 tableta byla rozpuštěna v 1 ml destilované vody) a 1 ml 100mM roztoku fenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF) v ethanolu (výsledná koncentrace 1 mM). Sonikace buněk probíhala celkem 16 minut za stálého chlazení v ledové lázni (v cyklech 15 s sonikování střídané 45 s klidu) při výkonu 55W. Po sonikaci byla směs nakonec 45 minut centrifugována při 4°C a 24000×g. Protein byl obsažen v supernatantu.

#### **3.3.2 Niklová chelatační chromatografie**

Niklová chelatační chromatografie je metoda využívající afinity nikelnatých iontů pevně ukotvených na nosiči kolony k histidinu, aminokyselině obsažené v proteinech. Histidin obsahuje imidazolový kruh, s jehož dusíkem nikelnaté ionty tvoří koordinačně kovalentní vazbu. Aby se dosáhlo co nejlepší vazby purifikovaného proteinu a omezila se kontaminace kolony nežádoucími proteiny, do sekvence proteinu se zavede takzvaná histidinová kotva – His-tag. Tato kotva je zakódována na konci proteinu v plazmidu a společně s ním je exprimována. Obsahuje šest za sebou jdoucích histidinů, což podstatně zvyšuje afinitu purifikovaného proteinu k nikelnatým iontům. Tento krátký aminokyselinový úsek většinou nenarušuje strukturu proteinu, i přesto je ale po použití nakonec odštěpen.

Chelatační chromatografie se provádí pomocí kolony obsahující 5 ml Chelating Sepharose Fast Flow nosiče. Nejdříve se kolona promyje podle následujícího návodu (za použití peristaltické pumpy): 20 ml deionizované vody, 15 ml STRIPP, 60 ml 0,1 M roztoku NiSO<sub>4</sub>, 15 ml deionizované vody a nakonec 15 ml pufru 1 pro chelatační chromatografii.

Pro vazbu proteinu s histidinovou kotvou na nosič byl použit vsádkový způsob při teplotě 4°C. Po zachycení proteinu byly nejdříve odstraněny nespecificky vázané proteiny

pomocí následujících roztoků: 20 ml pufru 1 pro chelatační chromatografii (tabulka 3.5) a 300 ml směsi pufrů 1 a 2 pro chelatační chromatografii v poměru 9:1 (66 mM). Nakonec byl gravitačně eluován protein 20 ml pufru 2 pro chelatační chromatografii (tabulka 3.6) s vysokým obsahem imidazolu, který kompetuje s histidinovou kotvou o vazbu na nikelnaté ionty. Eluovaný protein byl jímán po 1,5ml frakcích umístěných na ledu a výskyt proteinu v těchto frakcích byl monitorován pomocí SDS-PAGE na 15% gelu (kapitola 3.3.6). Vždy bylo použito 10  $\mu$ l proteinového standardu. Z frakcí bylo odebráno 10  $\mu$ l a smícháno s 5  $\mu$ l vzorkovacího pufru (kapitola 3.3.6) a vzorky byly krátce zahřáty na 100°C.

Kolona byla nakonec regenerována promytím podle následujícího postupu: 30 ml STRIPP (tabulka 3.7), 20 ml deionizované vody a 15 ml 20% ethanolu. Nakonec bylo přilito tolik 20% ethanolu, aby byl celý nosič ponořen, kolona byla uzavřena z obou stran a uskladněna pro další použití při teplotě 4°C.

**Tabulka 3.5:**

Pufř 1 pro chelatační chromatografii	500 ml
<hr/>	
PBS 1 $\times$	50 ml 10 $\times$ PBS
NaCl, výsledná koncentrace 0,5 M	14,6 g
imidazol, výsledná koncentrace 1 mM	0,035 g
$\beta$ -merkapt ethanol, výsledná koncentrace 2 mM	69,5 $\mu$ M

**Tabulka 3.6:**

Pufř 2 pro chelatační chromatografii	500 ml
<hr/>	
PBS 1 $\times$	50 ml 10 $\times$ PBS
NaCl, výsledná koncentrace 0,5 M	50 ml 5 M NaCl
imidazol, výsledná koncentrace 0,6 M	10,2 g
$\beta$ -merkapt ethanol, výsledná koncentrace 2 mM	69,5 $\mu$ M

**Tabulka 3.7:**

STRIPP	450 ml
<hr/>	
EDTA, 0,5M (pH=8)	300 ml
NaCl, 5M	150 ml

### 3.3.3 Dialýza

Dialýza je metoda, při které se od sebe oddělují molekuly na základě jejich velikosti a prostupnosti membránou po koncentračním spádu do okolního roztoku. Použitá dialyzační membrána propouští částice s molekulovou hmotností menší než přibližně 6-8kDa (cut-off 6000-8000 Da).

Frakce z niklové chelatační chromatografie, které podle SDS-PAGE obsahovaly protein, byly spojeny a přepipetovány do dialyzačního střeva. Po dvou hodinách dialýzy byla změřena absorbance, podle Lambert-Beerova ( $A = \epsilon \times c \times l$ , kde A je absorbance při 280 nm, l délka kyvety v cm a c koncentrace roztoku) byla vypočtena koncentrace a přidáno příslušné množství Precision proteasy (PP). 10 jednotek (U) PP specificky rozštěpí 1 mg fúzního proteinu, přičemž 1 U PP odpovídá 0,33  $\mu$ l. Tato proteasa odštěpila GST i N-terminální histidinovou kotvu, které jsou součástí fúzního proteinu kódovaného v plazmidu pGEX-6P-1. Dialýza probíhala proti 1 l dialyzačního pufru 1 (tabulka 3.8). Abychom mohli následující den chromatografii na katexu, po první dialýze (8h) následovala ještě jedna, proti pufru na kationtově výměnnou chromatografii, po dobu 16h. Dialyzační pufr v tabulkách 3.8 a 3.9.

#### Tabulka 3.8:

První dialyzační pufr	odměřené množství
10% (w/v) glycerol	100 g
TRIS, 20 mM, pH 7,5	20 ml 1M TRIS pH 7,5
EDTA, výsledná koncentrace 1 mM	2 ml 0,5 M EDTA
DTT, výsledná koncentrace 1 mM	0,154 g
doplněno deionizovanou vodou na 1 l	

#### Tabulka 3.9:

Pufr 1 na kationtově výměnnou chromatografii	odměřené množství
kyselina citrónová, výsledná koncentrace 50 mM	10,5 g
EDTA, výsledná koncentrace 2 mM	2 ml 0,5 M EDTA
DTT, výsledná koncentrace 2 mM	0,31 g
doplněno deionizovanou vodou na 1 l, upravit pH na 6,3 pomocí 1M NaOH, přefiltrováno přes membránový filtr s 0,45 $\mu$ m sítím	

### 3.3.4 Kationtově výměnná chromatografie

Kationtová výměnná chromatografie je metoda, která se obecně používá k separaci částic nesoucích kladný náboj. Podstatou separace je elektrostatická interakce kladně nabitých částic s negativně nabitou maticí SP sepharosy, kterou je naplněná chromatografická kolona. Kolona je ekvilibrována pufr 1 pro kationtově výměnnou chromatografii (tabulka 3.9, strana 23). Po nanesení proteinu FOXO3-DBD (teoretická hodnota pI FOXO3-DBD je 10,24) na kolonu se na ní tento protein naváže, protože při daném pH 6,3 (druhý dialyzační roztok) má kladný náboj. Teoretická hodnota pI odštěpené GST domény je 5,73; tedy má v dialyzačním pufru záporný náboj a na nosič se nenaváže. Kationtově výměnná chromatografie probíhá na koloně MonoS 5/50 (průměr/délka kolony v mm) o objemu 1 ml (maximální přípustný tlak na kolonu je 4MPa). Kolona byla připojena k přístroji ÄKTAprime pro FPLC. Výstupní data byla analyzována programem Unicorn 4.11.

Před kationtovou výměnou byl dialyzovaný vzorek i používané pufrы přefiltrovány. Po navázání proteinu na kolonu byl eluován gradientem iontové síly pomocí pufru 2 (tabulka 3.10) na kationtově výměnnou chromatografii (0 → 100%, během 10-20 min, rychlost průtoku 1 ml/1 min) a jednotlivé frakce jímány do mikroskopických nádob (počet se liší u každé purifikace, ale celkový objem spojených frakcí obsahující protein byl vždy přibližně 10 ml). Vlastnosti eluátu byly měřeny v ústí kolony, dále byly použity všechny frakce obsahující protein (měřena konduktivita, absorbance při 280 nm a tlak). Absorbance ve spojených frakcích byla změřena experimentálně a byla stanovena koncentrace proteinu podle Lambert-Beerova vztahu ( $A = \epsilon \times c \times l$ ). Molární absorpční koeficient byl vypočten teoreticky z primární sekvence proteinu pomocí programu ProtParam v databázi UniProt.<sup>[11]</sup>

#### **Tabulka 3.10:**

Pufr 2 na kationtově výměnnou chromatografii	odměřené množství
kyselina citrónová, výsledná koncentrace 50 mM	10,5 g
EDTA, výsledná koncentrace 2 mM	2 ml 0,5 M EDTA
DTT, výsledná koncentrace 2 mM	0,31 g
NaCl, výsledná koncentrace 1 M	58,4 g
doplněno deionizovanou vodou na 1 l, upravit pH na 6,3 pomocí 1M NaOH, přefiltrováno přes membránový filtr s 0,45 μm sítím	



### 3.3.5 Gelová permeační chromatografie

Tato metoda je hojně využívána k dělení látek podle jejich hydrodynamického poloměru. Kolona obsahuje částice porézního gelu, pokud možno všechny o stejné velikosti pórů, a částice obsažené v roztoku se na ní rozdělí. Částice s velkým hydrodynamickým poloměrem putují gelem mezi jeho částicemi a nejsou jím příliš brzděny, projdou tedy rychleji než části s menším hydrodynamickým poloměrem, které se dostanou do pórů v částicích gelu. Čím je kolona delší a póry gelu drobnější, tím lepší je rozdělení procházejících látek. Protichůdným dějem je difuze, která při příliš malé velikosti procházejících částic a částic gelu zpomalujících průchod kolonou příliš interferuje a znehodnocuje výsledky. Pro purifikaci proteinu byla použita kolona Superdex 75 10/300 (průměr/délka kolony v mm) o objemu 24 ml (maximální přípustný tlak na kolonu je 1,8MPa). Kolona byla připojena k přístroji ÄKTAprime pro FPLC. Výstupní data byla analyzována programem Unicorn 4.11.

Eluát z kationtově výměnné chromatografie byl zakoncentrován na objem 1,5 ml pomocí centrifugace při 1620×g v koncentrační zkumavce s membránou (MWCO 10 kDa, 4°C). Kolona byla před použitím ekvilibrována přefiltrovaným pufrem pro gelovou permeační chromatografii (tabulka 3.11). Při purifikaci <sup>15</sup>N značeného proteinu FOXO3 byl použit přefiltrovaný fosfátový pufr (tabulka 3.12, strana 26). Proteinový koncentrát byl filtrován přes 0,45 μm filtr a nadávkován na kolonu. Frakce obsahující protein byly jímány do mikrozkuvek. Výsledná molární koncentrace proteinu byla určena pomocí Lambert-Beerova zákona ( $A = \epsilon \times c \times l$ ). Protein byl nakonec zmražen a skladován při -80°C.

#### **Tabulka 3.11:**

Ekvilibrační pufr pro gelovou permeační chromatografii	odměřené množství
10% (w/v) glycerol	100 g
TRIS, výsledná koncentrace 50 mM	50 ml 1M TRIS pH 6,8
NaCl, výsledná koncentrace 100 mM	5,84 g
EDTA, výsledná koncentrace 1 mM	2 ml 0,5M EDTA
DTT, výsledná koncentrace 2 mM	0,31g
doplněno chlazenou deionizovanou vodou na 1 l	

**Tabulka 3.12:**

Fosfátový pufr	odměřené množství
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O, výsledná koncentrace 13,7 mM	2,137 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O, výsledná koncentrace 6,3 mM	2,253 g
KCl, výsledná koncentrace 50mM	3,730 g
DTT, výsledná koncentrace 5 mM	0,308 g
doplněno chlazenou deionizovanou vodou na 1 l	

**3.3.6 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS**

Elektroforetické metody obecně slouží k dělení nabitých částic v elektrickém poli. Jejich rychlost je přímo úměrná velikosti jejich náboje a nepřímo úměrná velikosti částic. Při elektroforéze prováděné v gelu se částice navíc dělí i gelovou filtrací, přičemž je rychlost průchodu částic gelem určena velikostí a tvarem částic. Pro dělení proteinů podle jejich velikosti a vlastně i molekulové váhy se používá metoda SDS-PAGE. Elektroforéza SDS-PAGE využívá porézní polyakrylamidový gel jako dělicí médium a proteiny jsou v tomto případě obaleny denaturačním činidlem dodecylsulfátem sodným (SDS), které se nespecificky váže na veškerý dostupný povrch proteinu a uděluje mu tedy uniformní záporný náboj (tabulky 3.13-18, str. 27-28). Elektrické pole v tomto případě slouží pouze jako hnací síla, která nutí proteiny proplétat se gelem v určitém směru. Větší proteiny mají sice větší náboj, ale jsou také více brzděny odporem prostředí, doputují tedy za stejnou dobu do menší vzdálenosti než proteiny kratší. Při použití vhodných kalibrantů (proteinů o známé molekulové hmotnosti) můžeme přibližně určit molekulové hmotnosti proteinů podle mobility v gelu.

Po každém dílčím kroku, tedy po niklové chelatační chromatografii, iontové výměnné chromatografii a gelové permeační chromatografii byly odebrány z každé jímané frakce vzorky, které byly upraveny podle následujícího návodu a podrobeny elektroforéze v SDS-PAGE (všechny 185 V, 50 min, 15% (v/v) polyakrylamidový gel).

Ke každému vzorku (10 µl) bylo přidáno stejné množství pufru pro přípravu vzorku (5 µl) a mikrozkuřavky s touto směsí byly krátce inkubovány při teplotě 100°C. Do prvního jamky gelu byl vždy pipetován standard molekulových vah Precision Plus Protein

Standard Dual Color, obsahující směs proteinů o molekulových hmotnostech 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 a 250 kDa.

Po ukončení elektroforézy byla provedena vizualizace proteinů v gelu po dobu 15 minut v barvicím roztoku (tabulka 3.19, str. 28). Poté byly gely odbarvovány v odbarvovacím roztoku (tabulka 3.20, str. 28). Odbarvovací roztok byl jednou až dvakrát obměněn, aby se proces urychlil. Výsledkem byly odbarvené gely s jasně viditelnými proužky proteinů, které zůstaly obarveny.

**Tabulka 3.13:**

Pufr pro přípravu vzorku	pipetovaný objem
TRIS	0,6 ml 1M, pH = 6,8
50% glycerol	5 ml
10% SDS	2 ml
$\beta$ -merkaptoethanol	0,5ml
1% bromfenolová modř	1 ml
deionizovaná voda	0,9 ml

**Tabulka 3.14:**

Složení separačního gelu	pipetovaný objem
Pufr pro separační gel	3 ml
Rotiphorese Gel 30	6 ml
10% (w/v) APS	0,1 ml
deionizovaná voda	2,88 ml
TEMED	0,012 ml

**Tabulka 3.15:**

Pufr pro separační gel	odměřené množství
2 M Tris-HCl, pH 8,8	75 ml
10% SDS	4 ml
deionizovaná voda	21 ml

**Tabulka 3.16:**

Složení zaváděcího gelu	pipetovaný objem
Pufr pro separační gel	1 ml
Rotiphorese Gel 30	0,5 ml
10% (w/v) APS	0,045 ml
deionizovaná voda	2,25 ml
TEMED	0,005 ml

**Tabulka 3.17:**

Pufr pro zaváděcí gel	odměřené množství
1 M Tris-HCl, pH 6,8	50 ml
10 % SDS	4 ml
deionizovaná voda	46 ml

**Tabulka 3.18:**

Pufr pro elektroforézu	výsledná koncentrace
TRIS-HCl, pH 8,3	50 mM
glycin	385 mM
SDS	0,1%

**Tabulka 3.19:**

Barvicí roztok	odměřené množství
CBB R250	1 g
methanol	450 ml
kyselina octová	100 ml
doplněno deionizovanou vodou na 1 l	

**Tabulka 3.20:**

Odbarvovací roztok	odměřené množství
methanol	100 ml
kyselina octová	100 ml
doplněno deionizovanou vodou na 1 l	

### 3.3.7 Nukleární magnetická rezonance

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je často používaná spektroskopická metoda, která využívá principu rezonance jaderných spinů a vnějšího elektromagnetického záření. Nukleony v jádře mají tendenci párovat své spiny, stejně jako elektrony, a tedy jádra se sudým počtem protonů i neutronů mají celkový spin 0, pokud mají jednu skupinu nukleonů lichou, pak mají poločíselný spin a pokud mají liché obě skupiny, mají spin celočíselný. NMR se dá použít pouze u jader s nenulovým spinem, protože v silném magnetickém poli dochází k rozštěpení energetických hladin. Elektromagnetickým pulsem se jádra excitují na vyšší hladinu a při následné relaxaci se uvolňuje měřitelné elektromagnetické záření. Rozštěpení hladin je závislé na stínění daného jádra jeho okolím, což umožňuje studium struktury molekul včetně molekul proteinů. Při měření proteinových spekter je třeba použít NMR spektrometr s velmi silným magnetickým polem, protože tato spektra jsou tak složitá, že je třeba vyššího rozlišení než u jednoduchých molekul. NMR spektrometr použitý pro zde popsany pokus pracoval na vodíkové frekvenci 600 MHz.

Pro měření spekter proteinů pomocí NMR je důležité, aby vzorek proteinu obsahoval atomy  $^{15}\text{N}$  anebo  $^{13}\text{C}$ , které jsou NMR aktivní a mají dostatečně vysoký gyromagnetický poměr. V této práci popsany vzorek byl značený  $^{15}\text{N}$  a  $^1\text{H}$ . Problémem jader  $^1\text{H}$  je, že je přítomný i v okolní vodě a spektrum takového vzorku by nebylo možno interpretovat, protože signál vody by byl o tolik silnější než signál proteinu, který bychom pak nemohli odlišit od šumu. Z tohoto důvodu se do vzorku přidává těžká voda ( $\text{D}_2\text{O}$ ), která umožňuje spektrometru potlačit signál vody a ve spektru se zobrazí pouze vodíkový signál z rozpuštěných látek.<sup>[23]</sup> Pro naměření  $^1\text{H}$  -  $^{15}\text{N}$  HSQC spektra pomocí NMR bylo nutné vzorek zakoncentrovat pomocí koncentrátoru na objem 700  $\mu\text{l}$ , aby byla co nejvyšší koncentrace proteinu. Vzorek musel obsahovat 10%  $\text{D}_2\text{O}$ . K 700  $\mu\text{l}$  vzorku bylo přidáno 80  $\mu\text{l}$   $\text{D}_2\text{O}$ . Pro měření byl použit NMR spektrometr Bruker Avance III. Potlačení signálu vody bylo provedeno metodou watergate.

## **4 VÝSLEDKY**

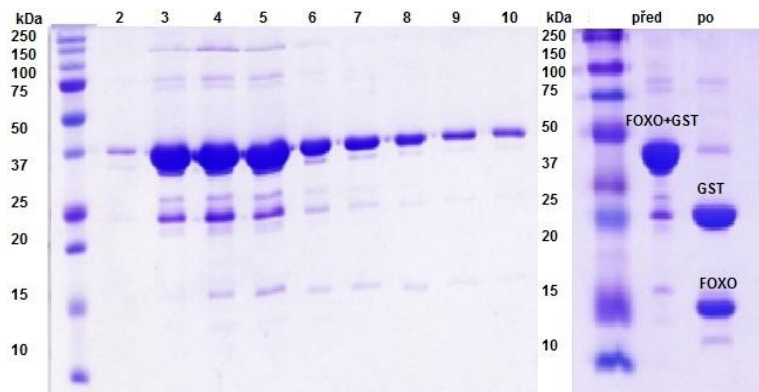
### **4.1 Purifikace FOXO3-DBD**

Při purifikaci FOXO3-DBD dochází k proteolytické degradaci, a proto bylo nutné optimalizovat purifikaci tak, aby byl získaný protein co nejčistší. Byla provedena série purifikačních kroků v pořadí, jak jsou zde zapsány, jejichž výsledkem byl roztok proteinu dostatečně čistý, aby bylo možné s ním dále pracovat. Výsledky každého dílčího kroku byly kontrolovány pomocí elektroforézy v 15% (v/v) polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS. Použitý standard byl u všech gelů stejný, Precision Plus Protein Standards (BioRad), obsahující proteiny o molekulové hmotnosti 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 a 10 kDa. Kationtově výměnná a gelová permeační chromatografie byly provedeny pomocí FPLC (ÅKTA, Amersham Biosciences). Následující obrázky gelů z SDS-PAGE názorně ukazují rozdíly mezi jednotlivými purifikacemi. Gely jsou seřazeny tak, jak po sobě purifikace ve skutečnosti probíhaly.

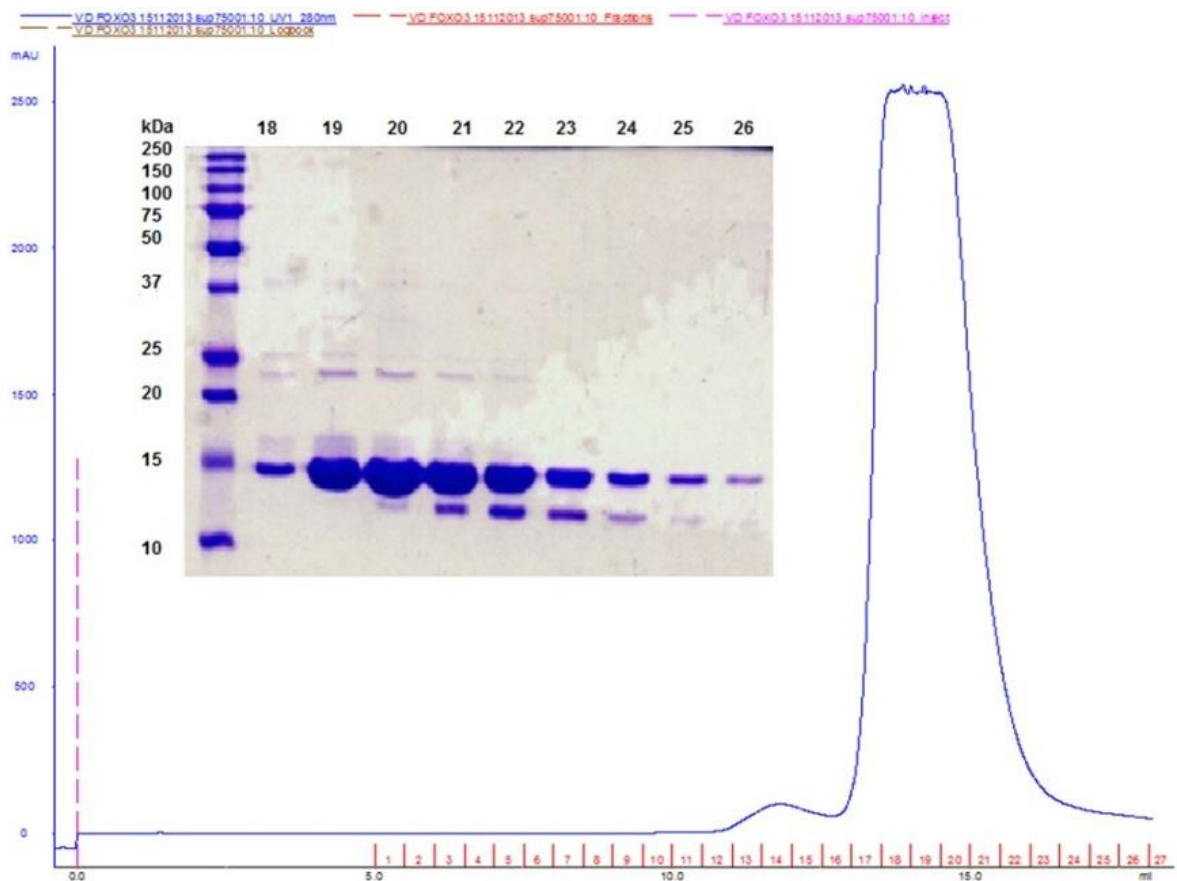
Jako ideální se ukázaly purifikace ze tří litrů bakteriální kultury. V případě kultivace na minimálním médiu bylo z důvodu nižšího výtěžku proteinu nutné provádět purifikace z šesti litrů. V tomto případě potřeba rozdělit sonikát na dvě poloviny a provést dvě oddělené niklové chelatační chromatografie. Další postup byl standardní. Pro přípravu proteinu pro NMR měření byl použit fosfátový pufr (tab. 3.12, str. 26) a protein již nebyl před vlastním NMR měřením zamrazován.

#### **4.1.1 První purifikace z LB média**

Expres byla prováděna z 3 l bakteriální kultury kultivované v LB médiu. Následná purifikace probíhala v pěti dnech. Po niklové chelatační chromatografii, odštěpení GST kotvy (obr. 4.1, str. 32) a následné dialýze byl vzorek zamražen. Po opětovném rozmražení byla provedena kationtově-výměnná chromatografie a gelová permeační chromatografie (obr. 4.2, str. 32). První purifikací bylo získáno ze tří litrů bakteriální kultury celkové množství 3,36 mg proteinu. Jak je patrné z obrázku 4.2 (str. 31), dochází pravděpodobně v důsledku zmražení vzorku po chelatační chromatografii k proteolytické degradaci proteinu. Z tohoto důvodu byl purifikační protokol upraven a byly minimalizovány prodlevy.



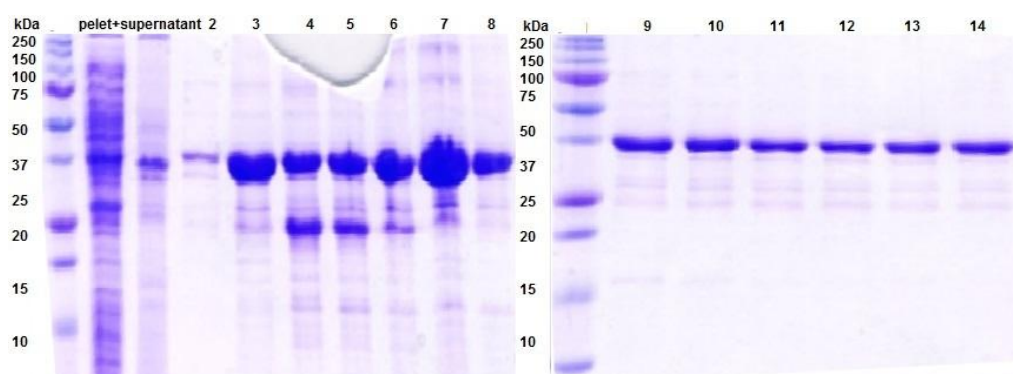
Obr. 4.1: 15 % (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah, dále frakce 2 – 10 eluované z niklové chelatační chromatografie v uvedeném pořadí (vlevo) a vzorek před a po štěpení fúzního proteinu FOXO3-DBD+GST pomocí PP (vpravo).



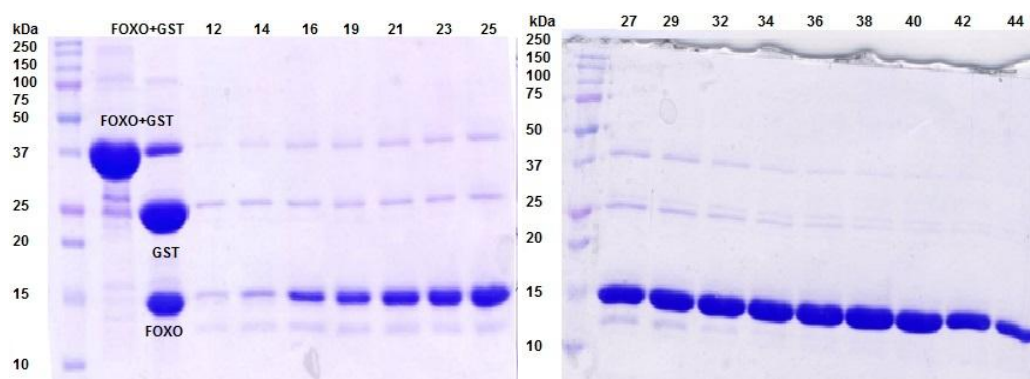
Obr. 4.2: Profil z gelové permeační chromatografie. Na ose x je vyneseno eluční objem, na ose y absorbance při naměřené vlnové délce 280 nm. Mobilní fázi tvořil přefiltrovaný pufr (složení viz tab. 3.11, str. 26), rychlost průtoku byla 0,5 ml/min. 15 % (v/v) polyakrylamidový gel zobrazuje standard molekulových vah a frakce 18-26 obsahující protein. Na gelu je dobře vidět frakce degradačních produktů.

#### 4.1.2 Druhá purifikace z LB média

Vzhledem k nevyhovujícímu výtěžku a proteolytické degradaci první purifikace bylo nutno provádět purifikaci co nejrychleji, pouze ve dvou dnech. Expresa byla prováděna z 3 l bakteriální kultury kultivované v LB médiu. Sonikace a niklová chelatační chromatografie byla provedena v jednom dni (obr. 4.3). Po dialýze a odštěpení GST kotvy byla hned následující den provedena jak kationtově-výměnná chromatografie (obr. 4.4-4.5, str. 33-34), tak i gelová permeační chromatografie (obr. 4.6, str. 34). Druhou purifikací bylo takto získáno přibližně 9 mg proteinu, tedy trojnásobné množství oproti minulé purifikaci. Jak ilustruje obrázek 4.6, došlo také k výraznému potlačení proteolytické degradace vzorku. Z tohoto důvodu byl tento postup použit i při přípravě  $^{15}\text{N}$  značeného proteinu.

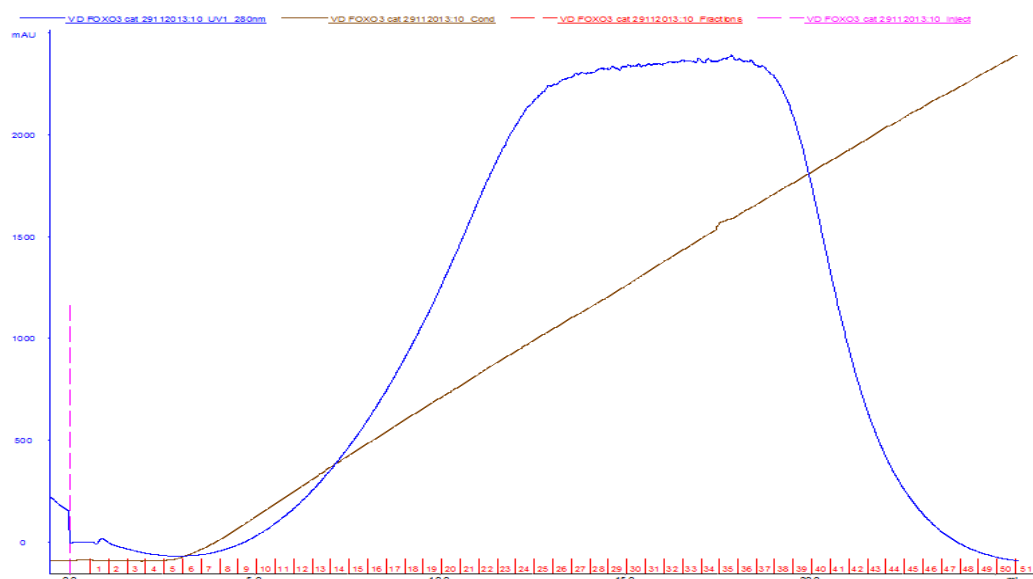


Obr. 4.3: 15 % (v/v) polyakrylamidové gely z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (první sloupec), dále vzorek peletu (druhý sloupec) a supernatantu (třetí sloupec), frakce 2 – 14 eluovaných z niklové chelatační chromatografie v uvedeném pořadí.

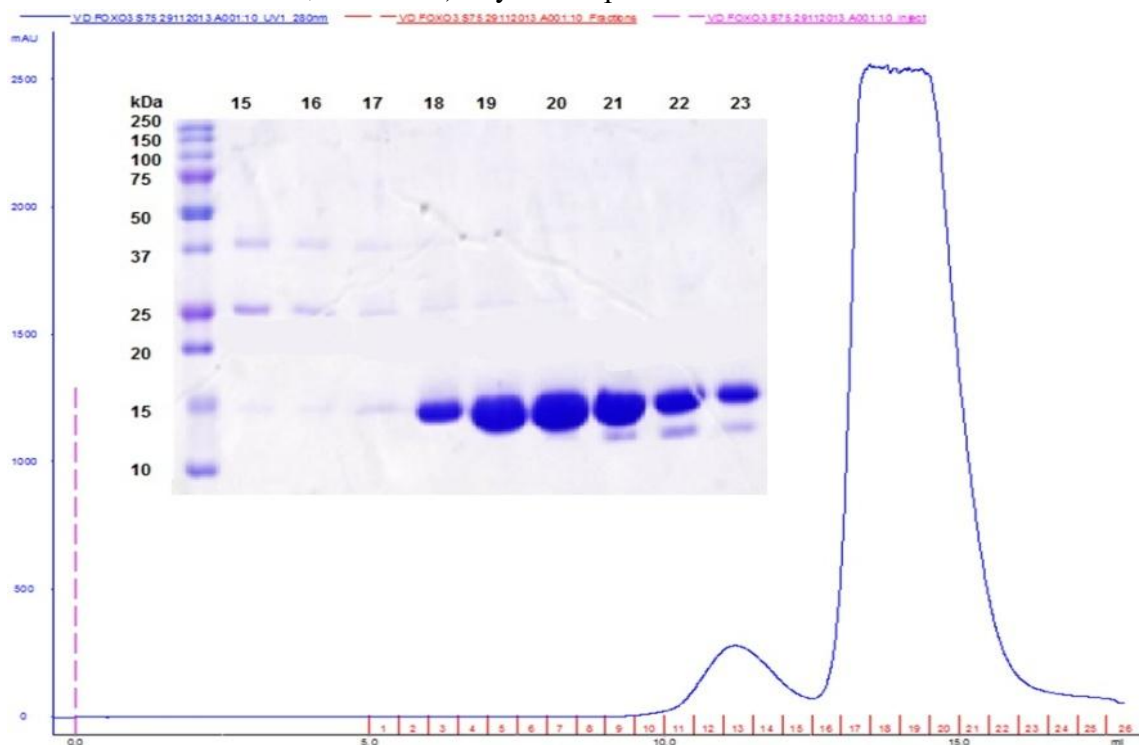


Obr. 4.4: 15 % (v/v) polyakrylamidové gely z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (první sloupec), dále vzorek fúzního proteinu FOXO+GST (druhý sloupec), stav po štěpení PP (třetí sloupec) a dále frakce číslo 12-44 z kationtově výměnné chromatografie, které obsahovaly protein FOXO3.





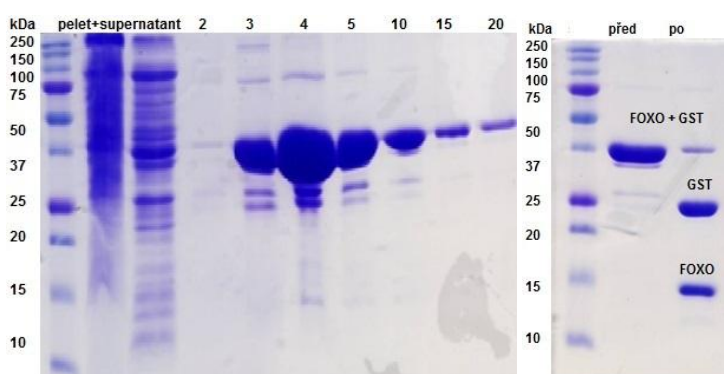
Obr. 4.5: Detail profilu z kationově výměnné chromatografie, modrá křivka znázorňuje absorbanci a hnědá konduktivitu na ústí kolony. Na ose x je vynesena eluční objem, na ose y absorbance při naměřené vlnové délce 280 nm. Eluce byla prováděna gradientem NaCl (o celkovém objemu 20 ml) v pufrech 1 a 2 pro kationově-výměnnou chromatografii (složení viz tab. 3.9-3.10, str. 23-24) s rychlostí průtoku 1 ml/min.



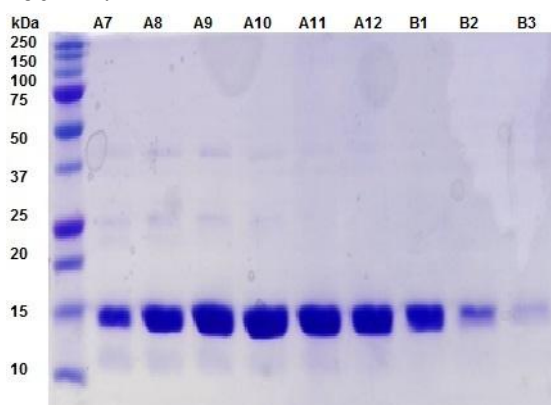
Obr. 4.6: Gelová permeační chromatografie. Na ose x je vynesena eluční objem, na ose y absorbance při naměřené vlnové délce 280 nm. Mobilní fázi tvořil přefiltrovaný pufr (složení viz tab. 3.11, str. 26), rychlost průtoku byla 0,5 ml/min. 15 % (v/v) polyakrylamidový gel zobrazuje standard molekulových vah a frakce 15-23 obsahující protein. Na gelu je vidět, že proteolytická degradace je menší než při předchozí purifikaci.

### 4.1.3 Purifikace z minimálního média

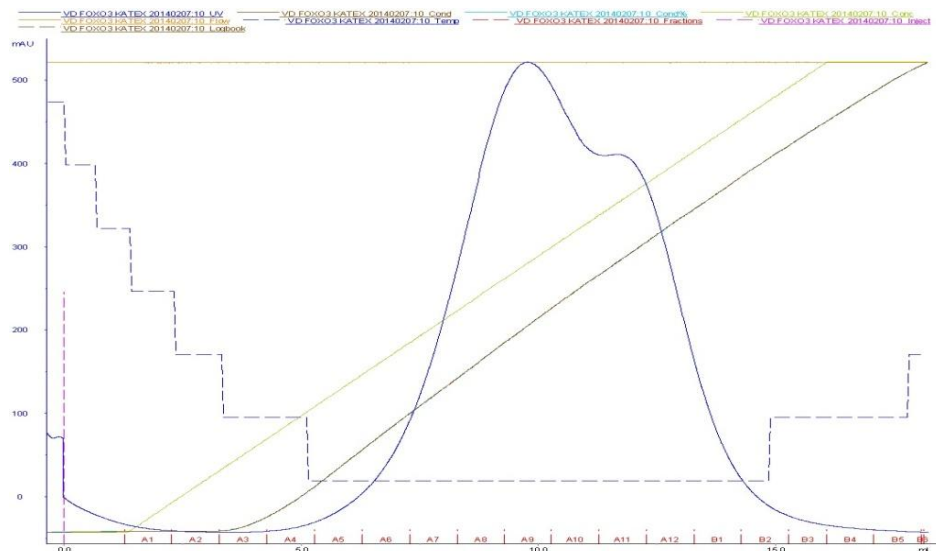
Pro přípravu proteinového vzorku 100% značeného izotopem  $^{15}\text{N}$  bylo nutné nejdříve otestovat kultivaci bakterií *E. coli* v minimálním médiu. Expresa byla prováděna z 3 l bakteriální kultury kultivované v minimálním médiu. Následná purifikace probíhala opět co nejrychleji, pouze ve dvou dnech. Sonikace a niklová chelatační chromatografie byla provedena v jednom dni (obr. 4.7). Po dialýze a odštěpení GST kotvy byla hned následující den provedena co nejrychleji jak kationtově-výměnná chromatografie (obr. 4.8-4.9, strana 35-36), tak i gelová permeační chromatografie (obr. 4.10, strana 36). Touto purifikací bylo získáno přibližně 2 mg proteinu.



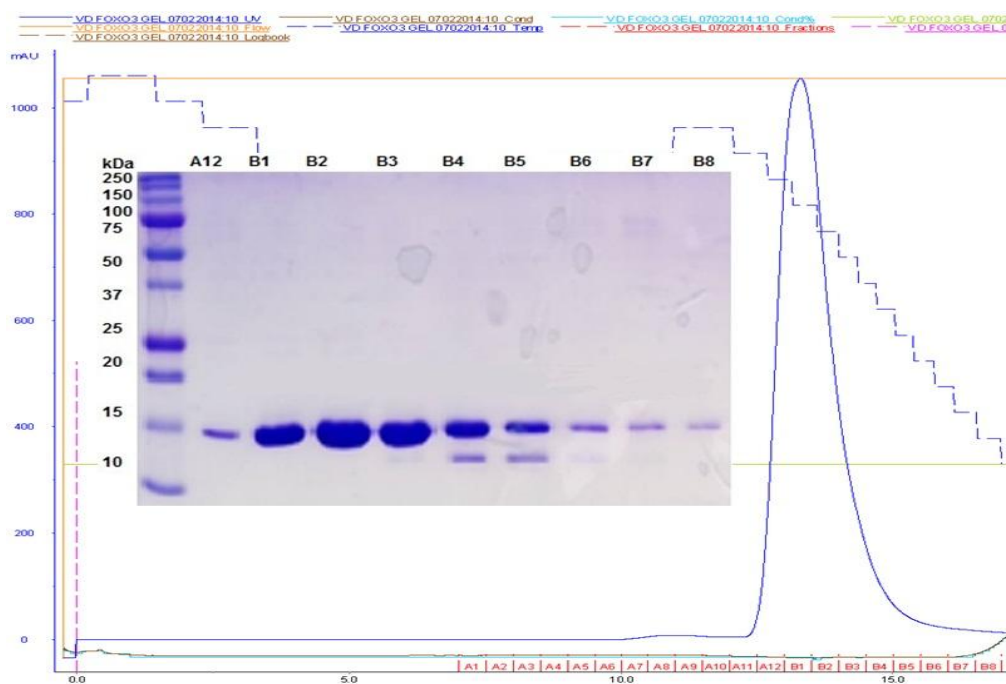
Obr. 4.7: 15 % (v/v) polyakrylamidové gely z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (první sloupec), dále vzorek peletu (druhý sloupec) a supernatantu (třetí sloupec), frakce 2 – 20 eluovaných z niklové chelatační chromatografie v uvedeném pořadí (levý gel). Gel vpravo obsahuje vzorek před a po štěpení fúzního protienu FOXO3-DBD+GST pomocí PP.



Obr. 4.8: 15 % (v/v) polyakrylamidové gely z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (první sloupec), dále frakce číslo A7-B3 z kationtově výměnné chromatografie, které obsahovaly protein FOXO3.



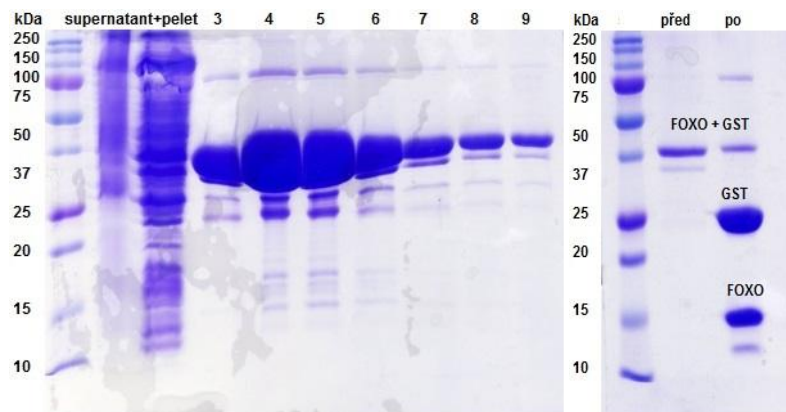
Obr. 4.9: Detail profilu z kationově výměnné chromatografie, modrá křivka znázorňuje absorbanci, hnědá konduktivitu. Na ose x je vyneseno eluční objem, na ose y absorbance při naměřené vlnové délce 280 nm. Eluce byla prováděna gradientem NaCl (o délce 15 ml) v pufrch 1 a 2 pro kationově-výměnnou chromatografii (složení viz. tab. 3.9-3.10, str. 23-24) s rychlostí průtoku 1 ml/min.



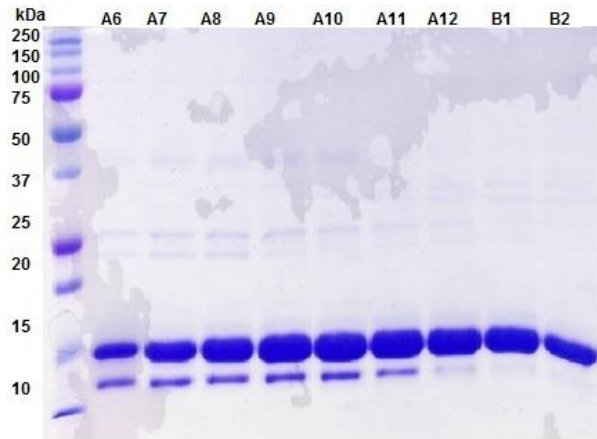
Obr. 4.10: Gelová permeační chromatografie, modrá křivka znázorňuje absorbanci. Na ose x je vyneseno eluční objem, na ose y absorbance při naměřené vlnové délce 280 nm. Mobilní fázi tvořil přefiltrovaný pufr (složení viz. tab. 3.11, str. 26), rychlost průtoku byla 0,5 ml/min. 15 % (v/v) polyakrylamidový gel zobrazuje standard molekulových vah a frakce A12-B8 obsahující protein.

#### 4.1.4 Purifikace $^{15}\text{N}$ značeného proteinu

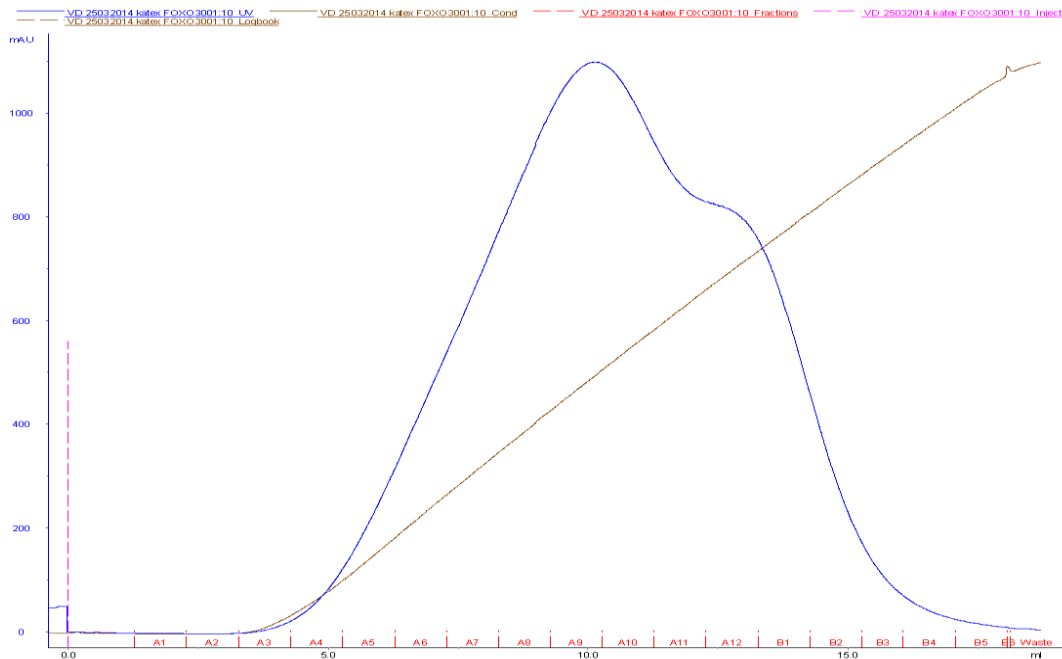
K získání dostatečného množství proteinu pro NMR měření byla exprese provedena z 6 l bakteriální kultury kultivované v minimálním médiu, tedy z dvojnásobného množství. Následná purifikace probíhala opět co nejrychleji, pouze ve dvou dnech. Pro dosažení maximálního výtěžku byl vzorek na sonikaci rozdělen do dvou částí a sonikován postupně. Čistota proteinu po niklové chelatační chromatografii je vidět na obrázku 4.11. Profil a gel z kationtově-výměnné chromatografie je zobrazen na obrázku 4.12-4.13 (str. 38). Gelová permeační chromatografie byla provedena ve fosfátovém pufru pH 6,5 (obr. 4.14, str. 39) a protein již nebyl před vlastním NMR měřením, které probíhalo hned následující den, zamražen. Touto purifikací bylo získáno přibližně 5,6 mg proteinu o koncentraci 2,8 mg/ml (190  $\mu\text{M}$ ), tedy dostatečné množství pro NMR měření. Jak ilustrují obrázky 4.13 a 4.14 (str. 37-38), dvojnásobný objem kultivačního média přinesl větší množství exprimovaného proteinu. Bohužel docházelo i k větší kontaminaci, která v důsledku vede ke zvýšené proteolytické degradaci získaného proteinu. Nicméně relativní poměr degradačních produktů umožňuje využít vzorek pro NMR měření.



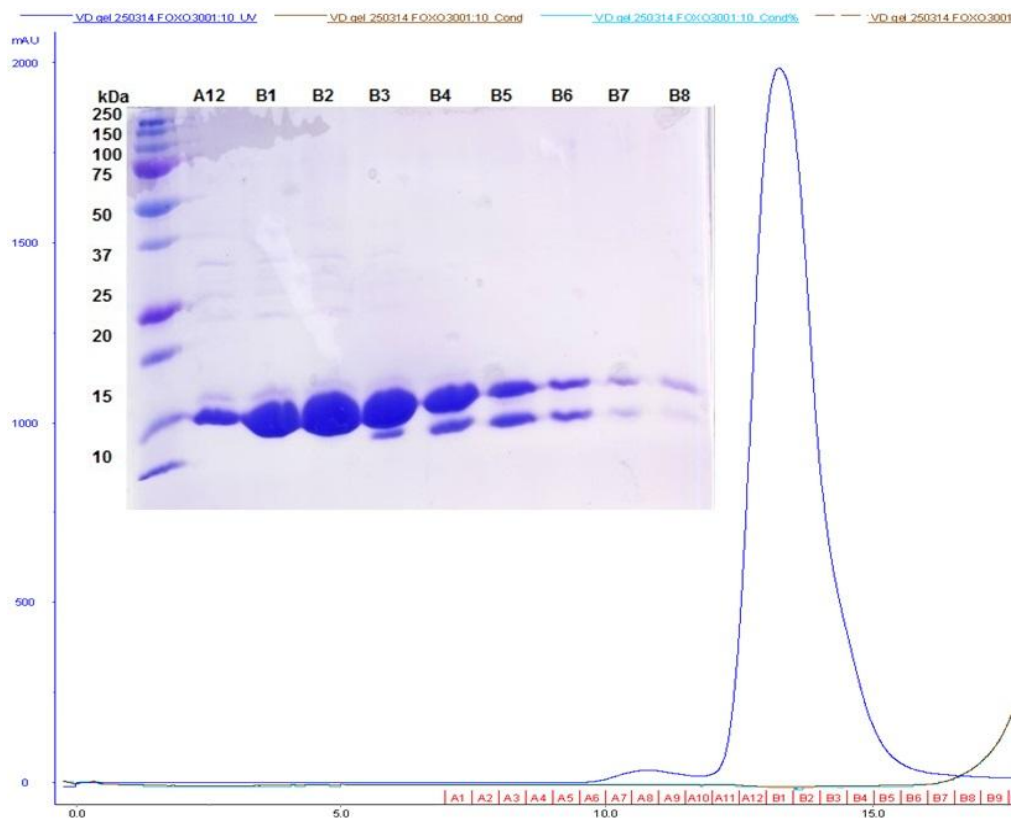
Obr. 4.11: 15 % (v/v) polyakrylamidové gely z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (první sloupec), dále vzorek supernatantu (druhý sloupec) a peletu (třetí sloupec), frakce 3 – 9 eluovaných z niklové chelatační chromatografie v uvedeném pořadí (levý gel). Gel vpravo obsahuje vzorek před a po štěpení fúzního proteinu FOXO3-DBD+GST pomocí PP.



Obr. 4.12: 15 % (v/v) polyakrylamidové gely z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (první sloupec), dále frakce číslo A6-B2 z kationtově výměnné chromatografie, které obsahovaly protein FOXO3.



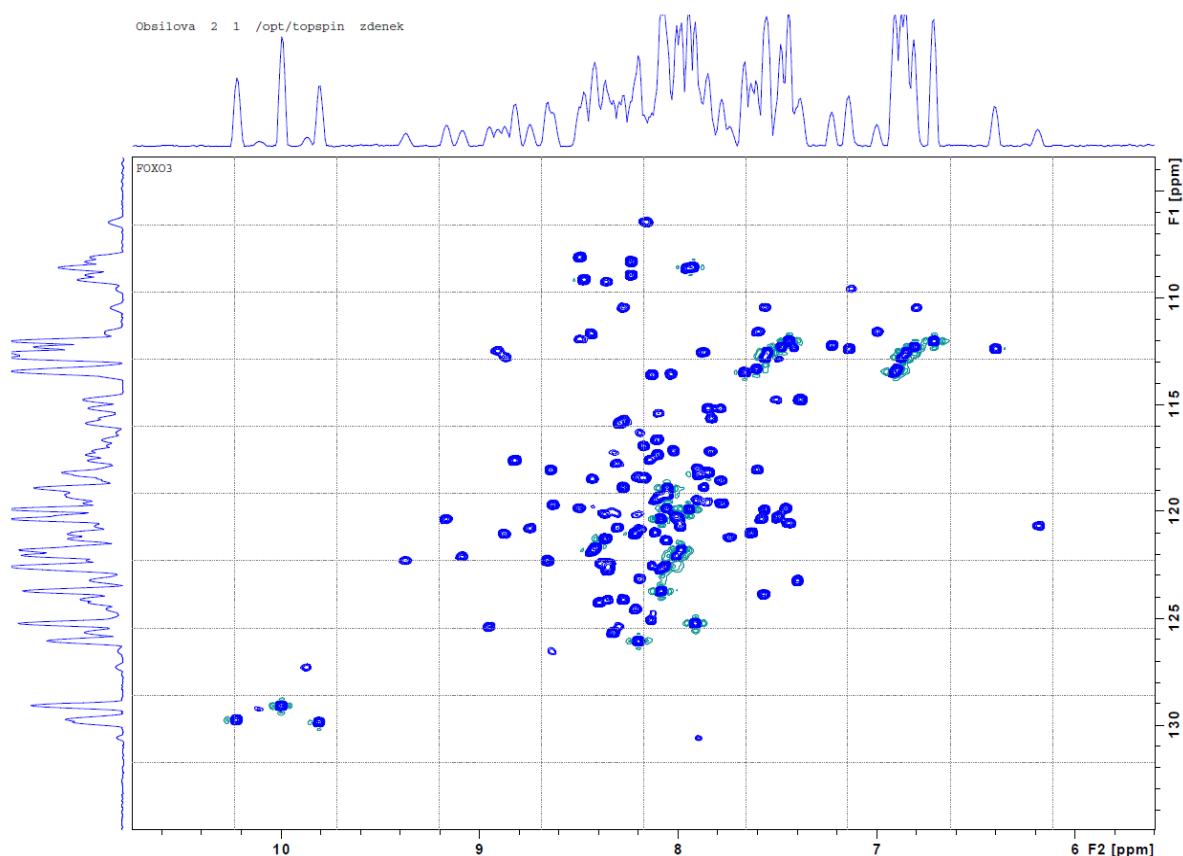
Obr. 4.13: Detail profilu z kationtově výměnné chromatografie, modrá křivka znázorňuje absorbanci, hnědá konduktivitu. Na ose x je vyneseno eluční objem, na ose y absorbance při naměřené vlnové délce 280 nm. Eluce byla prováděna gradientem NaCl (o délce 15 ml) v pufrách 1 a 2 pro kationtově výměnnou chromatografii (složení viz. tab. 3.9-3.10, str. 23-24) s rychlostí průtoku 1 ml/min.



Obr. 4.14: Gelová permeační chromatografie, modrá křivka znázorňuje absorbanci. Na ose x je vyneseno eluční objem, na ose y absorbance při naměřené vlnové délce 280 nm. Mobilní fázi tvořil přefiltrovaný fosfátový pufr o pH 6,5 (složení viz tab. 3.12, str. 26), rychlost průtoku byla 0,5 ml/min. 15 % (v/v) polyakrylamidový gel zobrazuje standard molekulových vah a frakce A12-B8 obsahující protein.

## 4.2 Nukleární magnetická rezonance

Zobrazené spektrum  $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$  HSQC (heteronuclear single quantum correlation) vzorku připraveného při purifikaci z  $^{15}\text{N}$  obsahuje neagregovaný protein s kompaktní strukturou (Obr. 4.15). Vzorek obsahoval protein FOXO3-DBD o koncentraci  $170\ \mu\text{M}$  ve vodném (90%  $\text{H}_2\text{O}/10\% \text{D}_2\text{O}$ ) fosfátovém pufru o pH 6,5. Měření probíhalo na NMR spektrometru Bruker Avance III s vodíkovou frekvencí 600 MHz. Veškerou práci s přístrojem a vyhodnocování spekter zastal RNDr. Zdeněk Tošner, PhD.



4.15:  $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$  HSQC spektrum značeného FOXO3-DBD (modře), vykazuje velkou podobnost se spektrem publikovaným Wang et al.<sup>[24]</sup> (zeleně).

## **5 DISKUSE**

FOXO3-DBD je doménou FOXO3 transkripčního faktoru zodpovědnou za vazbu na DNA *in vivo*. Tento děj je důležitý regulační faktor, který buňkám pomáhá odolávat oxidačnímu stresu pomocí kontroly exprese ochranných proteinů. Funkce FOXO3 tedy ovlivňuje metabolismus, buněčnou proliferaci a senescenci a obecně i stárnutí organismu jako celku.

Cílem této práce bylo optimalizovat expresní a purifikační protokol FOXO3 a připravit značený protein pro další pokusy s nízkomolekulárními ligandy zkoumané pomocí nukleární magnetické rezonanční spektroskopie. Původní protokol byl přejat z článku Bouřa et al.<sup>[14]</sup>, ale postupem práce byl několikrát upraven. Postupně byla exprese a purifikace provedena čtyřikrát. Poprvé po expresi v LB médiu s purifikací provedenou v průběhu pěti dní se zmražením a uskladněním částečně purifikovaného vzorku. Pokud purifikace nebyla provedena dostatečně rychle, docházelo ke značné proteolytické degradaci, výtěžek byl nízký a vzorek obsahoval velké procento degradačních produktů. Poté opět na LB médiu, ale s purifikací během dvou dní a zmražením a uskladněním až finálního produktu. Proto byla purifikace zopakována se zkrácenou dobou na dva dny, což výrazně zlepšilo kvalitu vzorku a umožnilo získání vyššího výtěžku čistšího proteinu. Na této purifikaci bylo také ověřeno množství Precision proteasy potřebné pro dostatečně kvalitní odštěpení GST a His-tagu od FOXO3-DBD, aby ve vzorku nezůstával nerozštěpený komplex a nesnižoval se tak výtěžek izolace.

Následná purifikace na minimálním médiu byla koncipována tak, aby se dodržela co nejkratší možná doba purifikace a zároveň aby se optimalizoval růst bakterií na definovaném minimálním médiu. Účelem této purifikace bylo ověřit, zda je možné použít izotopově značené minimální médium k expresi značených proteinů. Exprese i purifikace proběhla podle očekávání, výtěžek byl nižší než při expresi na LB médiu, ale proteolytická degradace byla nízká. Nižší výtěžek byl způsoben menší bohatostí minimálního média na živiny oproti LB médiu a tím způsobeným zpomalením růstu bakterií, respektive prodloužením lag fáze a tedy oddálením fáze exponenciálního růstu.

Poslední provedená purifikace byla provedena na <sup>15</sup>N značeném médiu. Zdrojem těžkého izotopu dusíku byl <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl. Z předchozích purifikací byly zjištěny přesné podmínky provedení exprese i purifikace a pokus proběhl dle očekávání. Výtěžek byl



obdobný jako při expresi a purifikaci z minimálního média a hladina proteolytické degradace byla nízká.

Naše naměřené  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrum  $^{15}\text{N}$ -značeného FOXO3-DBD vykazuje velkou podobnost se spektrem publikovaným Wang et al.<sup>[24]</sup> (obr. 4.15, str. 39). To ukazuje, že připravený značený FOXO3-DBD má správnou terciární strukturu a může být použit pro další studie. Podobnost spekter také značně zjednoduší sekvenční přiřazení aminokyselinových zbytků FOXO3-DBD stejně tak, jako urychlí strukturní studie komplexů FOXO3-DBD s vybranými sloučeninami.

Následovat bude výzkum vazebných vlastností připraveného preparátu a nízkomolekulárních ligandů pomocí NMR spektroskopie. Cílem tohoto výzkumu je najít specifické inhibitory FOXO3, které jsou zároveň již schválené americkým úřadem pro kontrolu léčiv (FDA) a zjistit, zda jsou vhodné pro klinickou praxi.

## **6 ZÁVĚR**

Hlavní stanovený cíl této bakalářské práce byl úspěšně splněn. Byla dokončena optimalizace purifikačního protokolu DNA-vazebné domény lidského forkhead transkripčního faktoru FOXO3(FOXO3-DBD) v bakteriích *Escherichia coli*. Protokol je plně využitelný pro přípravu proteinu FOXO3 pro strukturní studie pomocí nukleární magnetické rezonance. Doba purifikačního procesu byla zkrácena na dva dny, což vedlo k potlačení proteolytické degradace. Bylo ukázáno, že protein FOXO3 je stabilní ve fosfátovém pufru a že tento pufr je vhodný pro NMR měření. Testovaný purifikační protokol tedy umožňuje přípravu miligramových množství čistého stabilního neagregovaného proteinu FOXO3, který je vhodný pro další NMR měření.

## **7 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY**

- [1] Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L.: kapitola DNA, RNA and the Flow of Genetic Information v knize *Biochemistry*, W.H.Freeman and co., New York, str. 109-138 (2012)
- [2] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: kapitola How Cells Read the Genome: From DNA to Protein v knize *Molecular biology of the cell*, Garland science, New York, str. 329-410 (2008)
- [3] Lee, H.H., Frasch M.: *Developmental Dynamics*, 229 (2004)
- [4] Zhu, X., Ahmad, S.M., Aboukhalil, A., Busser, B.W., Kim, Y., Tansey, T.R., Haimovich, A., Jeffries, N., Bulyk, M.L., Michelson, A.M.: *Development*, 139 (2012)
- [5] Kaestner, K.H., Knochel, W., Martinez, D.E.: *Genes & Development*, 14 (2000)
- [6] Obsil, T., Obsilova, V.: *Oncogene*, 27 (2008)
- [7] Burgering, B. (2008). A brief introduction to FOXOlogy. *Oncogene*, 27, stránky 2258-2262.
- [8] Eijkelenboom, A., Burgering, B.: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14 (2013)
- [9] van der Heide, L.P., Hoekman, M.F.M, Amidy, M.P.: *Biochemistry*, 380 (2004)
- [10] Obsilova, V., Obsil, T., Silhan, J., Boura, E., Teisinger, J.: *Physiological Research*, 57 (2008)
- [11] Databáze UniProt, čerpáno 5.1.2014  
[http://www.uniprot.org/uniprot/O43524#section\\_seq](http://www.uniprot.org/uniprot/O43524#section_seq)
- [12] van der Horst, A., Burgering, B.: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, (2007)
- [13] Transcription factor encyclopedia, zpracováno M.S.C. Wilson a E.W.-F. Lamem (2009), čerpáno 4.1.2014  
<http://www.cisreg.ca/cgi-bin/tfe/articles.pl?tfid=443&tab=structure>
- [14] Boura, E., Obsilova, V., Obsil, T., Brynda, J., Rezabkova, L.: *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 66 (2010)
- [15] Clark, K., Halay, E., Lai, E., Burley, S.: *Nature*, 364 (1993)
- [16] Tsai, K.L., Huang, C.Y., Yang, J.Y., Sun, Y.J., Hung, M.C., Hsiao, C.D.: *Nucleic Acids Res*, 35 (2007)
- [17] Bouřa, E., Herman, P., Obřil, T., Obřilová, V., řilhan, J., řulc, M., Teisinger, J.: *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (2007)

- [18] Kops, G.J., Dansen, T.B., Polderman, P.E., Saarloos, I., Wirtz, K.W., Coffey, P.J., Huang, T.T., Bos, J.L., Medema, R.H., Burgering, B.M.: *Nature*, 419 (2002)
- [19] Brunet, A., Calnan, D.R.: *Oncogene*, 27 (2008)
- [20] Obsil, T., Obsilova, V.: *Semin Cell Dev Biol.*, 22 (2011)
- [21] Yang, X., Lee, W.H., Sobott, F., Papagrigoriou, E., Robinson, C.V., Grossmann, J.G, Sundström, M., Doyle, D.A., Elkins, J.M.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 46 (2006)
- [22] Huang, H., Tindall, D.J.: *Biochimica et Biophysica Acta*, 11 (2011)
- [23] Allen, J.P.: kapitola NMR v knize *Biophysical chemistry*, Blackwell publishing., Hoboken, str. 344-372 (2008)
- [24] Wang, F., Marshall, C.B., Yamamoto, K., Li, G.-Y., Plevin, M.J., You, H., Mak, T.W., Ikura, M.: *The Journal of Molecular Biology*, 384 (2008)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

jméno a příjmení	adresa	číslo občanského průkazu	datum vypůjčení	poznámka