

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Katedra didaktiky chemie

## Diplomová práce



Příprava DNA vazebné domény  
transkripčního faktoru FoxO4 pro tryptofanová  
fluorescenční měření

Petr Vácha

Vedoucí práce:

RNDr. Tomáš Obšil, PhD.

---

2006

## Poděkování:

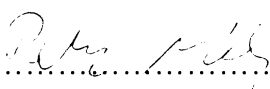
Za pečlivé a trpělivé vedení této diplomové práce bych chtěl poděkovat zejména RNDr. Tomáši Obšilovi PhD.. Obzvláště si cením jeho vstřícného přístupu a pomoci i v případě záležitostí, které se přímo netýkaly diplomové práce. Dále bych rád velmi poděkoval RNDr. Veronice Obšilové PhD. za její ochotu se kterou mi pomáhala při části práce vykonávané v její laboratoři v FgÚ AV ČR a bez jejíž pomoci bych asi ještě dnes bloudil tímto ústavem.

Velký dík patří mým rodičům, kteří mě po celý život podporují a vytvářejí podmínky pro nerušené studium.

Na závěr bych chtěl poděkovat Tereze Nečesané, která mi byla oporou během celého studia na této vysoké škole.

„Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Tomáše Obšila, PhD. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.“

V Praze dne..... 5. 5. 2006 .....

.....  


Petr Vácha

## Seznam použitých zkratek

<b>14-3-3</b>	– 14-3-3 proteiny jsou rodina regulačních proteinů vyskytujících se v eukaryotických organismech
<b>14-3-3<math>\zeta</math></b>	– lidský 14-3-3 protein s označením zéta
<b>14-3-3<math>\zeta</math> no W</b>	– mutantní forma 14-3-3 $\zeta$ neobsahující tryptofan
<b>AFX</b>	– starý, dnes již málo používaný název FoxO4 proteinu
<b>ATP</b>	– adenosin - 5' - trifosfát
<b>BL21(DE3)</b>	– kmen <i>E.coli</i> určený pro expresi rekombinantních proteinů
<b>bp</b>	– pár bazí (baze pair)
<b>BSA</b>	– bovine serum albumin (hovězí sérový albumin)
<b>cDNA</b>	– komplementární DNA (complementary DNA)
<b>CK1</b>	– kasein kináza 1 (casein kinase 1)
<b>DAF-16</b>	– forkhead transkripční faktor hlístice <i>Caenorhabditis elegans</i>
<b>DEAE</b>	– diethylaminoethyl
<b>dFoxO</b>	– forkhead transkripční faktor octomilky
<b>DNA</b>	– deoxyribonukleová kyselina
<b>DNA (xxtal1/2)</b>	– fragment o délce 11 bp, jenž odpovídá sekvenci lidské DNA, na kterou se FoxO proteiny specificky váží <i>in vivo</i>
<b>dNTP</b>	– směs deoxyribonukleotidů
<b>dpFoxO4<sub>11-213</sub></b>	– FoxO4 <sub>11-213</sub> fosforylovaný na Thr-28 a Ser-193
<b>dsDNA</b>	– double strand DNA (dvojřetězcová DNA)
<b>DTT</b>	– dithiotreitol
<b>E. coli</b>	– bakterie <i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	– ethylendiamintetraoctová kyselina
<b>EMSA</b>	– „Electrophoretic Mobility Shift Assay“
<b>F</b>	– zkratka pro aminokyselinu fenylalanin
<b>FoxO</b>	– FoxO proteiny patří do třídy „O“ Fox transkripčních faktorů (Fox je zkratka z Forkhead box)
<b>FoxO4<sub>11-213</sub></b>	– úsek proteinu FoxO4 od 11. do 213. aminokyselinového zbytku
<b>FoxO4<sub>11-213</sub></b>	– Je FoxO4 <sub>11-213</sub> , v jehož struktuře byly zmutovány kodony pro tryptofanové zbytky (W) na kodony pro fenylalaninové (F) zbytky a to na pozicích 29, 97 a 126 (= FoxO4 <sub>11-213</sub> fin W)
<b>W29,97,126F</b>	
<b>FoxO4<sub>11-213</sub> fin W</b>	– viz FoxO4 <sub>11-213</sub> W29,97,126F
<b>GTPáza</b>	– guanosintrifosfát kináza
<b>GST</b>	– glutathion-S-transferáza

<b>His-Tag</b>	– řetěz šesti histidinů na N-konci fuzního proteinů
<b>HPLC</b>	– vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography )
<b>IGF</b>	– insulin growth factor (inzulinový růstový faktor)
<b>IGFR</b>	– insulin growth factor receptor (receptor inzulínového růstového faktoru)
<b>Ins</b>	– inzulín
<b>InsR</b>	– inzulínový receptor
<b>IPTG</b>	– isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
<b>LB medium</b>	– kultivační medium dle Luria - Bertani
<b>M4</b>	– standard molekulových hmotností (Mix 4) obsahující směs proteinů o relativních molekulových hmotnostech 97 000, 67 000, 45 000 a 29 000
<b>M5</b>	– standard molekulových hmotností (Mix 5) obsahující směs proteinů o relativních molekulových hmotnostech 29 000, 21 000, 12 500 a 6 500
<b>MCO</b>	– údaj o velikosti pórů v membráně dialyzačního střeva (molecular cut off)
<b>NES</b>	– nuclear export sequence (jaderná exportní sekvence)
<b>NLS</b>	– nuclear localization sequence (jaderná lokalizační sekvence)
<b>NMR</b>	– nukleární magnetická rezonance
<b>P</b>	– zkratka pro fenylalanin
<b>PBS</b>	– fosfátový pufr obsahující $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , $\text{KCl}$ a $\text{NaCl}$
<b>PCR</b>	– polymerázová řetězová reakce
<b>pET15b</b>	– komerčně dodávaný plazmid, který lze vpravit do hostitelských buněk.
<b>pGEX-4T-1</b>	– komerčně dodávaný plazmid, který lze vpravit do hostitelských buněk.
<b>Phe</b>	– aminokyselina fenylalanin
<b>pI</b>	– izoelektrický bod
<b>PI3K</b>	– fosfoinositid 3- kináza
<b>PIP<sub>2</sub></b>	– fosfatidylinositol- 4,5 bisfosfát
<b>PIP<sub>3</sub></b>	– fosfatidylinositol-3,4,5 trisfosfát
<b>PKB (Akt)</b>	– protein kináza B
<b>PMSF</b>	– fenylmethylsulfonyl chlorid – inhibitor proteáz
<b>R</b>	– aminokyselina arginin
<b>rpm</b>	– počet otáček za minutu (revolutions per minute)

<b>S</b>	– aminokyselina serin
<b>SDS</b>	– dodecylsírán sodný
<b>SDS-PAGE</b>	– polyakrylamidová elektroforéza v prostředí dodecylsírany sodného (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoreses)
<b>Ser</b>	– aminokyselina serin
<b>TBE</b>	– Tris – Borate -EDTA
<b>TEMED</b>	– N,N,N,N -tetramethyl-ethylenediamin
<b>TEV</b>	– tobacco etch virus (virus tabákové mozaiky)
<b>TGG</b>	– kodon pro aminokyselinu tryptofan
<b>Tris</b>	– tris (hydroxymethyl) aminomethan
<b>Trp</b>	– aminokyselina tryptofan
<b>TTC</b>	– kodón pro aminokyselinu fenylalanin
<b>W</b>	– aminokyselina tryptofan
<b>Y</b>	– aminokyselina tyrosin

# Obsah

<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>3</b>
<b>Obsah</b> .....	<b>6</b>
<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>2 LITERÁRNÍ ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
2.1 FOXO TRANSKRIPČNÍ FAKTORY .....	10
2.1.1 Vliv FoxO transkripčních faktorů na různé buněčné děje .....	11
2.1.2 Fosforylace FoxO transkripčních faktorů.....	13
2.1.3 Vliv fosforylace na vnitrobuněčnou lokalizaci FoxO transkripčních faktorů.....	14
2.2 14-3-3 PROTEINY .....	16
2.2.1 Způsob a podmínky interakce 14-3-3 proteinů s jejich vazebnými partnery.....	16
2.2.2 Mechanismy funkce 14-3-3 proteinů .....	17
2.3 KOMPLEX PROTEINŮ 14-3-3 $\zeta$ : FOXO4 .....	18
<b>3 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE</b> .....	<b>20</b>
<b>4 METODY</b> .....	<b>21</b>
4.1 CÍLENÁ BODOVÁ MUTAGENEZE .....	21
4.1.1 Mutagenezní PCR.....	21
4.1.2 Agarózová elektroforéza DNA.....	25
4.1.3 Transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i> JM109 .....	26
4.1.4 Izolace plazmidové DNA .....	27
4.1.5 Transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i> BL21(DE3) .....	28
4.1.6 Příprava glycerolového roztoku bakteriální kultury.....	28
4.2 EXPRESE A PURIFIKACE PROTEINU FOXO4 <sub>11-213</sub> FIN W.....	29
4.2.1 Expres rekombinantního proteinu FoxO4 <sub>11-213</sub> fin W .....	29
4.2.2 Purifikace rekombinantního proteinu FoxO4 <sub>11-213</sub> fin W.....	30
4.2.2.1 <i>Sonikace</i> .....	30
4.2.2.2 <i>GST afinitní chromatografie</i> .....	30
4.2.2.3 <i>Specifické štěpení TEV proteázou</i> .....	32
4.2.2.4 <i>Dialýza</i> .....	32
4.2.2.5 <i>Kationtové výměnná chromatografie</i> .....	33
4.2.2.6 <i>Zkoncentrování roztoků proteinů</i> .....	34
4.2.2.7 <i>Gelová filtrace</i> .....	35
4.2.2.8 <i>SDS-PAGE</i> .....	36
4.2.3 Fosforylace FoxO4 <sub>11-213</sub> fin W .....	38
4.3 EXPRESE A PURIFIKACE PROTEINU 14-3-3 $\zeta$ NO W .....	39
4.3.1 Expres proteinu 14-3-3 $\zeta$ no W.....	39
4.3.2 Purifikace proteinu 14-3-3 $\zeta$ no W.....	40
4.3.2.1 <i>Niklová chelatační chromatografie</i> .....	40
4.3.2.2 <i>Thrombinové štěpení</i> .....	41
4.3.2.3 <i>Aniontové výměnná chromatografie</i> .....	42
4.4 OVĚŘENÍ VAZEBNÝCH VLASTNOSTÍ PŘIPRAVENÝCH PROTEINŮ .....	44
4.4.1 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay).....	44
4.4.2 Ověření DNA vazebných vlastností FoxO4 <sub>11-213</sub> fin W .....	45
4.4.3 Ověření vazebných vlastností 14-3-3 $\zeta$ no W.....	46

<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>48</b>
5.1	MUTAGENEZE .....	48
5.1.1	Mutagenezní PCR .....	49
5.1.2	Agarózová elektroforéza DNA po PCR a štěpení restrikčním enzymem Dpn I .....	49
5.1.3	Transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i> BL21(DE3) .....	50
5.1.4	Izolace plazmidové DNA .....	50
5.1.5	Sekvenace mutantní DNA proteinu FoxO4 <sub>11-213</sub> fin W .....	50
5.2	EXPRES E A PURIFIKACE FOXO4 <sub>11-213</sub> FIN W .....	52
5.2.1	Expres FoxO4 <sub>11-213</sub> fin W .....	52
5.2.2	Sonikace .....	52
5.2.3	GST afinitní chromatografie .....	53
5.2.4	Specifické štěpení TEV proteázou .....	54
5.2.5	Kationově výměnná chromatografie .....	55
5.2.6	Gelová filtrace .....	57
5.3	EXPRES E A PURIFIKACE PROTEINU 14-3-3ζ NO W .....	59
5.3.1	Expres proteinu 14-3-3ζ no W .....	59
5.3.2	Sonikace .....	59
5.3.3	Niklová chelatační chromatografie .....	59
5.3.4	Thrombinové štěpení .....	61
5.3.5	Anionově výměnná chromatografie .....	62
5.4	OVĚŘENÍ VAZEBNÝCH VLASTNOST PURIFIKOVANÝCH PROTEINŮ .....	64
5.4.1	Ověření DNA vazebných vlastností FoxO4 <sub>11-213</sub> fin W .....	65
5.4.2	Ověření vazebných vlastností 14-3-3ζ no W .....	66
<b>6</b>	<b>DISKUSE .....</b>	<b>68</b>
6.1	PŘÍPRAVA MUTANTNÍ FORMY PROTEINU FOXO4 <sub>11-213</sub> .....	68
6.2	EXPRES E A PURIFIKACE FOXO4 <sub>11-213</sub> FIN W .....	69
6.3	EXPRES E A PURIFIKACE 14-3-3ζ NO W .....	70
6.4	OVĚŘENÍ VAZEBNÝCH VLASTNOSTÍ PURIFIKOVANÝCH PROTEINŮ .....	71
6.4.1	Ověření DNA vazebných vlastností FoxO4 <sub>11-213</sub> fin W .....	71
6.4.2	Ověření vazebných vlastností 14-3-3ζ no W .....	72
<b>7</b>	<b>SOUHRN VÝSLEDKŮ .....</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>74</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY .....</b>	<b>75</b>
<b>10</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>79</b>
	Příloha 1 .....	79
	Příloha 2 .....	80
	Příloha 3 .....	81
	Příloha 4 .....	82
	Příloha 5 .....	83
	Příloha 6 .....	84

# 1 Úvod

**Protein FoxO4** patří do skupiny savčích forkhead transkripčních faktorů. FoxO proteiny zastávají v buňce funkci aktivátorů transkripce. Díky této funkci hrají FoxO proteiny důležitou roli v nejrůznějších buněčných procesech, jako je např. programovaná buněčná smrt (apoptóza), kontrola buněčného cyklu, regulace buněčného metabolismu či ochrana proti oxidativnímu stresu. Funkce FoxO transkripčních faktorů je regulována fosforylací protein kinázou B (PKB) a interakcí s regulačním 14-3-3 proteinem. Fosforylace a následná vazba 14-3-3 proteinu způsobují inhibici interakce FoxO proteinů s DNA a jejich rychlý export z jádra do cytoplasmy. Molekulární mechanismy regulace transkripční aktivity FoxO faktorů jsou stále velmi málo prostudovány. Jejich detailní pochopení je vzhledem k biologickému významu FoxO proteinů velmi důležité pro řadu biomedicínských oborů.

**14-3-3 proteiny** jsou rodina regulačních proteinů, které jsou exprimovány ve všech eukaryotních buňkách. Hlavní vlastností 14-3-3 proteinů je jejich schopnost vázat jiné proteiny a peptidy. Těmito vazebnými interakcemi 14-3-3 proteiny ovlivňují strukturu a funkci svých vazebných partnerů. Podmínkou efektivní interakce mezi 14-3-3 proteinem a jeho vazebným partnerem je fosforylace specifického motivu v molekule vazebného partnera. Vzhledem k velkému počtu vazebných partnerů se 14-3-3 proteiny podílí na řadě biologicky důležitých buněčných procesů od kontroly buněčného cyklu, kontroly buněčné smrti, regulace buněčného metabolismu, až po modulaci přenosu signálu.

Přesné molekulární mechanismy, kterými 14-3-3 proteiny ovlivňují funkce svých vazebných partnerů jsou však stále velmi málo prostudované.

Obě výše zmíněné proteinové rodiny ovlivňují v organismu, každá svým způsobem, řadu významných dějů. Multifunkční působení 14-3-3 proteinů je umožněno jejich schopností vázat se na rozličné vazebné partnery. Díky této schopnosti jsou velmi účinnými regulátory signálních drah, což jenom umocňuje rozmanitost možností jejich působení. U proteinu FoxO4 jsou možnosti jeho rozmanitého působení umožněny jiným, ale neméně účinným způsobem. FoxO4 jako transkripční faktor má schopnost ovlivnit svou aktivitou transkripci většího počtu genů. V určité oblasti se působení 14-3-3 proteinů a FoxO4 proteinu díky jejich vzájemné interakci protíná. Společně dokáží ovlivňovat děje jako apoptóza, buněčný cyklus a odpověď na oxidativní stres. A právě v této skutečnosti se nachází odpověď na otázku, proč tyto proteiny studovat.



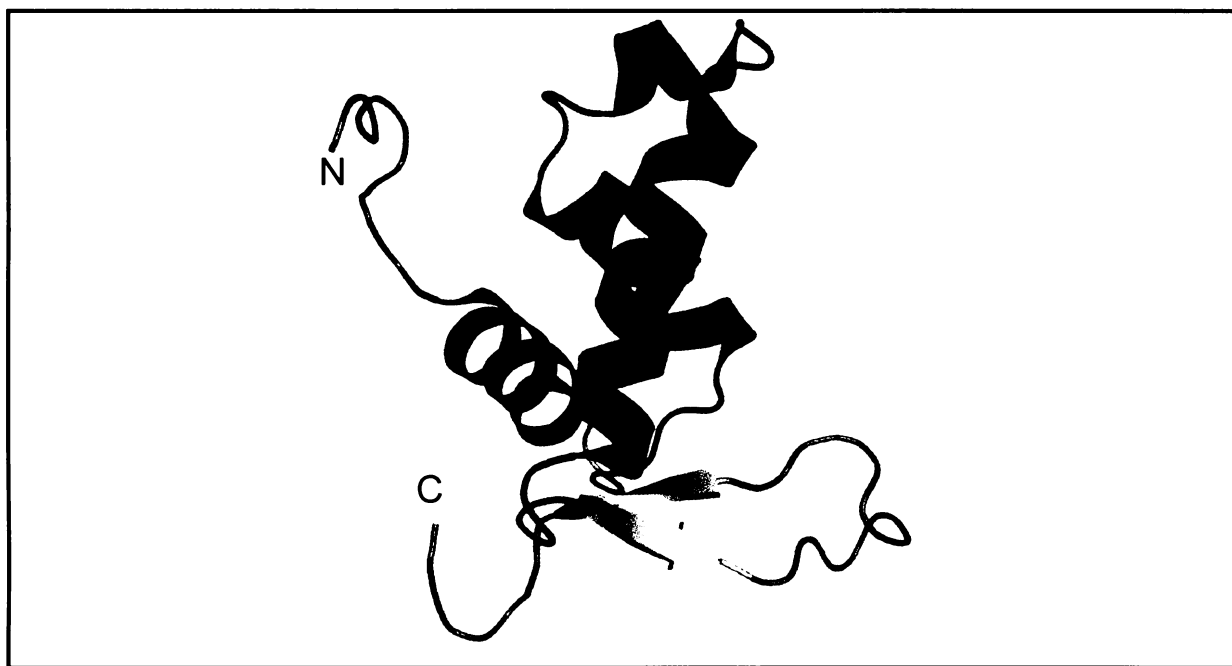
Dnes je již obecně známo, že nepřetržité poškozování funkčního aparátu buňky zevnitř, oxidací nejrůznějšími látkami, nebo-li oxidativní stres, je synonymem pro stárnutí buňky a následně celého organismu. Neustálý boj člověka proti stárnutí a smrti a snaha o prodloužení délky a kvality života je dnes, v popředí zájmu možná více, než kdy bývaly. S tím souvisí do značné míry i další dva zmiňované buněčné děje, apoptóza a buněčný cyklus. Poruchy těchto dvou dějů, které ve své podstatě mohou vycházet ze špatného fungování FoxO proteinů a 14-3-3 proteinů mohou vést k nekontrolovanému buněčnému dělení a ke vzniku nádorů.

Z těchto důvodů se zdá velmi užitečné a perspektivní tyto proteiny studovat podrobněji. Objasnění elementárních způsobů jejich fungování a kompletní poznání jejich role v organismu, kterým se zabývá mnoho laboratoří zaměřených na základní výzkum, se může stát základním kamenem pro vědce pracující v aplikovaném výzkumu a dovést je ke konkrétním způsobům využití těchto znalostí.

## 2 Literární úvod

### 2.1 FoxO transkripční faktory

FoxO je skupina savčích proteinů, do které se řadí: FoxO1 (též nazýván FKHR), FoxO3a (též nazýván FKHL1), FoxO4 (též nazýván AFX) a FoxO6. [1,2] FoxO proteiny patří do třídy „O“ rodiny Fox transkripčních faktorů (Fox je zkratka odvozená od výrazu „Forkhead box“). Fox transkripční proteiny jsou charakterizovány typickou forkhead DNA vazebnou doménou. Tato DNA doména zahrnuje přibližně 100 aminokyselinových zbytků uspořádaných do tří  $\alpha$ -helixů, tří krátkých úseků  $\beta$ -struktury a dvou charakteristických smyček zvaných též „křídla“ [3-6] (Obr. 2.1).



**Obr. 2.1 DNA-vazebná doména transkripčního faktoru FoxO4.** Obrázek znázorňuje strukturu proteinu FoxO4, který odpovídá jeho DNA-vazebné doméně. Červeně jsou znázorněny zmíněné  $\alpha$ -helixy, žlutě  $\beta$ -struktury a zeleně, v dolní části molekuly, charakteristická křídla.

Obdoby savčích FoxO proteinů byly identifikovány i v několika dalších organismech. V hlístici *Caenorhabditis elegans* byl identifikován forkhead transkripční faktor DAF-16, řízený stejně jako proteiny FoxO obdobou signální dráhy PI3K-PKB aktivované insulinovým receptorem. U octomilky *Drosophila melanogaster*

je obdobný protein nazýván dFoxO. Tato skutečnost dokumentuje, že signální dráha začínající insulinovými receptory a končící forkhead transkripčními faktory je evolučně dobře konzervována a univerzálně využívána organismy od těch nejprimitivnějších po ty nejsložitější.

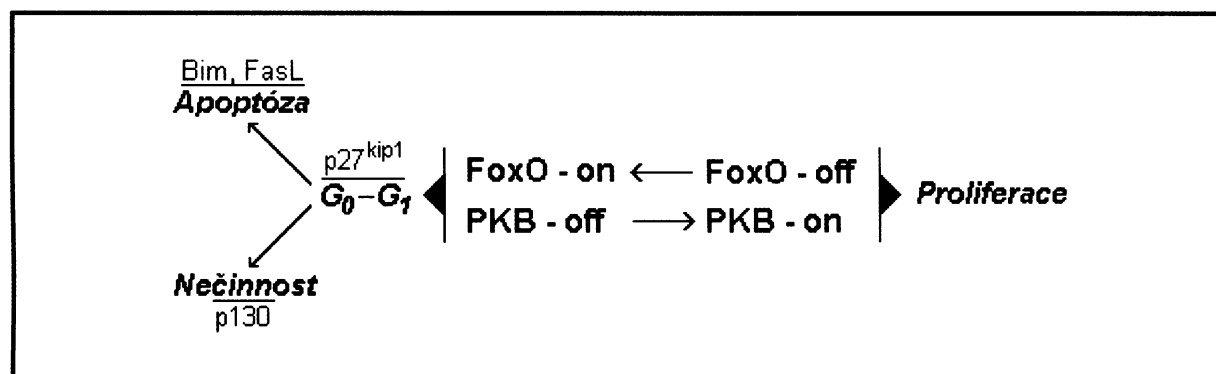
Všechny FoxO proteiny jsou aktivátory transkripce genů a vždy se váží jako monomery ke specifické sekvenci DNA:  $5' \text{TTGTTTAC} 3'$  [1,7]. Mimo to jsou FoxO proteiny schopny také nepřímo ovlivňovat transkripci genů. Tuto svojí schopnost uplatňují interakcí s jadernými receptory, které v závislosti na druhu ligandu působí na transkripci genů [8,9]. FoxO proteiny hrají důležitou roli v nejrůznějších buněčných procesech zahrnujících apoptózu, regulaci buněčného cyklu, odpověď na stres a vznik nádorů.

### 2.1.1 Vliv FoxO transkripčních faktorů na různé buněčné děje

FoxO transkripční faktory se podílí na regulaci buněčného cyklu, apoptózy, buněčného metabolismu a odpovědi na oxidativní stres. Funkce nebo lépe řečeno dysfunkce FoxO transkripčních faktorů zasahuje do nejrůznějších patologických dějů, od rakoviny, přes diabetes, po stárnutí organismu.

- **Regulace apoptózy** – FoxO proteiny indukují buněčnou smrt' (apoptózu) regulací transkripce řady genů. Například FoxO3a aktivuje transkripci cytokinu Fas. Cytokin Fas svou vazbou na Fas - receptor na povrchu buňky spouští buněčnou smrt' řízenou Fas signální dráhou [13, 31 -38].
- **Odpověď na oxidativní stres** – Geny regulované FoxO transkripčními faktory zahrnují i geny pro antioxidantní enzymy. Tyto enzymy podporují odolnost buňky vůči volným radikálům [47,48]. Tato funkce FoxO transkripčních faktorů je velmi zajímavá z hlediska poškozování buňky, které se na této úrovni rovná stárnutí.
- **Regulace buněčného metabolismu** – U savců způsobuje aktivita FoxO proteinů posun glukózového metabolismu od glykolýzy ke glukogenezi. Schopnost FoxO proteinů regulovat buněčný metabolismus, jak se zdá, přispívá k celkovému prodloužení délky života organismů [54-58].
- **Regulace buněčného cyklu** – FoxO transkripční faktory se podílí na pozastavení progresu nebo uvěznění buňky v  $G_1$  nebo i v  $G_2$  fázi buněčného cyklu. Buňka se pak dostává do klidové  $G_0$  fáze. V  $G_1$  fázi totiž FoxO proteiny aktivují transkripci inhibitoru buněčného cyklu  $p27^{kip1}$  a tak vlivem transkripční aktivity FoxO proteinů může dojít až k uvěznění buňky v  $G_1$  fázi. O dalším osudu buňky poté rozhoduje produkce

dalších proteinů (Bim, FasL, p130)(obr. 2.2). V  $G_2$  fázi buněčného cyklu dochází k pozastavení progresu buňky došlo-li k poškození DNA. To vede FoxO transkripční faktory k aktivaci transkripce proteinu gadd45, který se podílí na uvěznění buňky v  $G_2$  fázi buněčného cyklu. V M fázi buněčného cyklu naopak FoxO transkripční faktory regulují expresi genů, které jsou nezbytné pro správné rozdělení buňky během mitózy [39-46].



**Obr. 2.2 Negativní PKB – FoxO kontrola běhu buněčného cyklu [87].** Tento obrázek znázorňuje negativní PKB – FoxO kontrolu buněčného cyklu, kdy při aktivitě PKB jsou FoxO proteiny inhibovány a v organismu dochází k proliferaci. Pokud je situace opačná a PKB je neaktivní, FoxO proteiny aktivují transkripční faktor  $p27^{kip1}$ , který je zodpovědný za uvěznění buňky v  $G_1$  fázi a buňka přechází do fáze  $G_0$ . O dalším osudu buňky potom rozhodují další faktory.

- **Role FoxO při karcinogenezi** – Skutečnost, že FoxO proteiny hrají určitou roli při vzniku nádorů byla naznačena objevem sekvencí kódujících FoxO proteiny, které jsou součástí chromozomální translokace u jistého typu rakoviny. U tohoto typu přispívá ke vzniku nádorů fúze proteinů vznikající v důsledku zmíněné translokace. Jedním z těchto proteinů je i transkripční faktor FoxO [84,85]. Dále bylo prokázáno, že špatná regulace metabolických drah, jejichž součástí jsou i FoxO transkripční faktory, může vést ke vzniku nádorů (např. produkt FoxO regulovaného genu  $p27^{kip1}$  potlačuje vznik nádorů). Také samotná dysfunkce FoxO transkripčních faktorů může mít podíl na vzniku nádorů. Např. fúze transkripční domény FoxO transkripčních faktorů s DNA vazebnou doménou jiných transkripčních faktorů, byla detekována při akutní leukémii a v rhabdomyosarkomu [49-54].

## 2.1.2 Fosforylace FoxO transkripčních faktorů

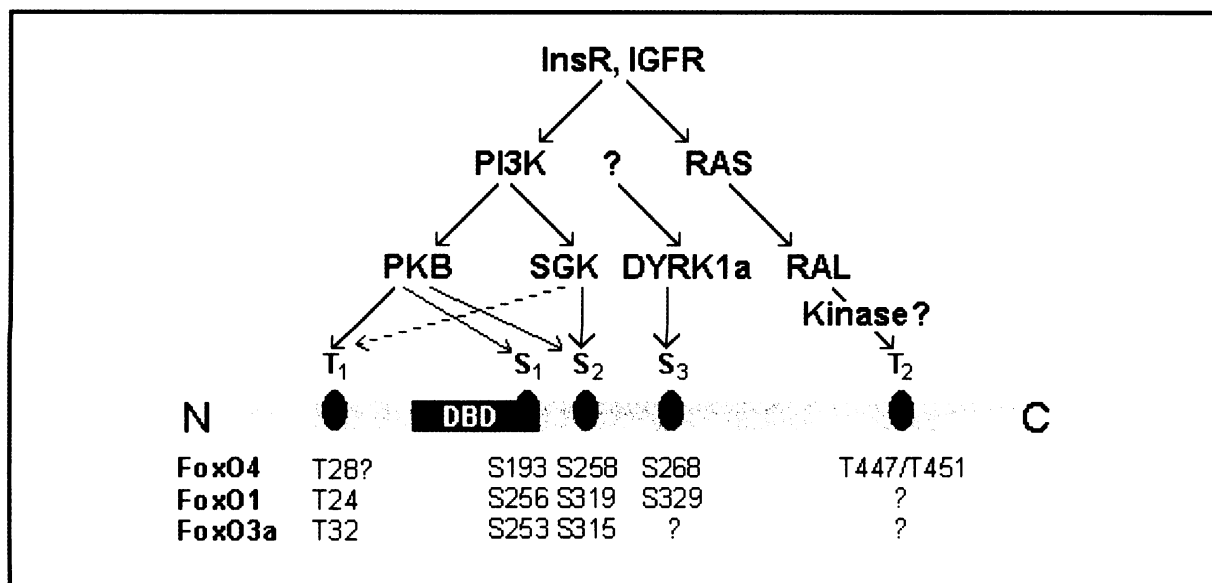
FoxO transkripční faktory jsou regulovány podněty z několika signálních kaskád. Hlavní činitel v regulaci FoxO proteinů je PI3K-PKB (phosphoinositide 3-kinase-protein kinase B) signální dráha. Mezi další regulační činitele patří CK1 (casein kinase), DYRK1a (dual-specificity regulated kinase) a Ras-Ral signální dráha (Ral-GTPase), které pouze modulují funkce FoxO transkripčních faktorů. Všechny tyto kinázy, s výjimkou Ral-GTPázy, regulují intracelulární lokalizaci FoxO proteinů fosforylací několika fosforylačních míst ve struktuře FoxO transkripčních faktorů [1,7,10,11].

Signální dráha PI3K je aktivována vazbou růstového faktoru (např. insulinu) k příslušnému receptoru na povrchu buňky. Přítomnost růstového faktoru vede k fosforylaci (a aktivaci) PI3K, což má za následek produkci sekundárních poslů  $PIP_3$  (fosfatidylinositol-3,4,5 trisfosfát) a  $PIP_2$  (fosfatidylinositol- 4,5 bisfosfát) těsně pod povrchem cytoplazmatické membrány. Tito sekundární poslové poté aktivují proteinovou kinázu B (PKB nebo též Akt) [12-14]. Sekvence PKB fosforylačního místa je RXRXXS/T (kde R  $\equiv$  arginin, X je jakýkoliv aminokyselinový zbytek, S  $\equiv$  serin/ T  $\equiv$  threonin).

Fosforylace FoxO transkripčních faktorů je prvním krokem k inhibici jejich DNA vazebných vlastností, což následně vede k inhibici translace genů jimi regulovanými, a co více, fosforylace FoxO proteinů na rozeznávacích místech PKB má za následek export FoxO proteinů z buněčného jádra do cytoplazmy [15-18].

FoxO transkripční faktory mohou být fosforylovány na několika fosforylačních místech. Obvykle se tato místa označují  $T_1$  a  $T_2$  pro threoninová rezidua a  $S_1$ ,  $S_2$  a  $S_3$  pro serinová rezidua. Pozice těchto míst se u jednotlivých druhů FoxO proteinů liší (obr. 2.3). Tato fosforylace je na začátku signální dráhy vyvolána obecně růstovými faktory, konkrétně například insulinem (Ins) nebo insulinovým růstovým faktorem (IGF), respektive jejich vazbou na příslušné receptory (InsR, IGFR). Následně je spuštěno několik variant signálních drah zakončených různými druhy kináz (obr.2.3).

Fosforylace DYRK1a, SGK a Ras-Ral signální drahou vede k urychlení exportu výše zmíněných FoxO transkripčních faktorů z jádra do cytoplazmy. Fosforylace FoxO4 Ral-GTPázou podporuje jeho transkripční aktivitu [21]. Přidá-li se ovšem fosforylace Ral-GTPázou k fosforylaci PKB, transkripční aktivita se ještě více inhibuje. FoxO6 obsahuje pouze dvě dobře konzervovaná fosforylační místa pro PKB a žádné pro SGK a DYRK1a, což vede k převažujícímu výskytu FoxO6 v jádře [2].



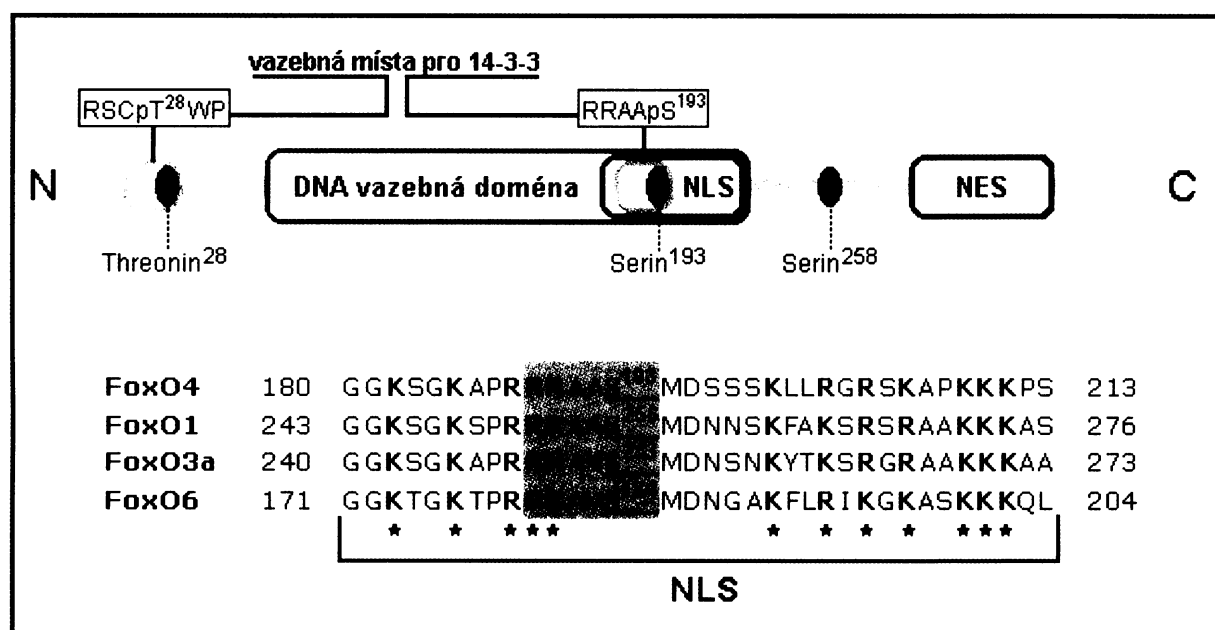
**Obr. 2.3 Fosforylační místa a signální dráhy ovlivňující funkci FoxO proteinů [upraveno podle 87].** FoxO1, FoxO3a a FoxO4 obsahují vždy po třech fosforylačních místech, která mohou být fosforylována protein kinázou B (PKB), dále jedno fosforylační místo pro dual-specifity tyrosine-regulated kinase 1a (DYRK1a), jedno fosforylační místo pro serum- and glucocorticoide-inducible kinase (SGK) [87]. FoxO4 obsahuje ve své struktuře ještě navíc jedno fosforylační místo pro fosforylaci Ral dependentní kinázou.

### 2.1.3 Vliv fosforylace na vnitrobuněčnou lokalizaci FoxO transkripčních faktorů

Bez přítomnosti růstových faktorů na povrchu buňky jsou FoxO proteiny převážně lokalizovány v jádře. Jestliže však dojde k vazbě růstového faktoru na příslušný receptor, aktivuje se PI3K-PKB signální dráha. Nejprve dochází k fosforylaci FoxO transkripčních faktorů proteinkinázou B (PKB) a následně k fosforylaci dalších fosforylačních míst (viz výše). Fosforylace způsobí navázání 14-3-3 proteinu, který zakryje jadernou lokalizační sekvenci. Důsledkem této interakce je transport FoxO proteinů z jádra a inhibice transkripční aktivity. Pro efektivní interakci musí být vazební partneři 14-3-3 proteinů fosforylováni na serinovém nebo threoninovém zbytku. Skutečnost, že po fosforylaci FoxO proteinů proteinkinázou B dochází k interakci se 14-3-3 proteiny, byla již dříve potvrzena. Tato interakce se zdá být důležitá za prvé pro uvolnění FoxO proteinů z DNA, a za druhé k exportu FoxO proteinů z jádra do cytoplazmy a jejich setrvání tam [11, 14,17, 22].

Lokalizace FoxO transkripčních faktorů v buňce je regulovaná přítomností jaderné lokalizační sekvence (NLS) a jaderné exportní sekvence (NES) ve struktuře FoxO proteinů. Všechny FoxO proteiny obsahují neklasickou NLS, která je tvořena 12 aminokyselinovými zbytky (Foxo1, 3a, 4: 5 argininových a 7 lysinových zbytků;

FoxO6: 4 argininové a 8 lysinových zbytků) obklopujícími fosforylační místo pro PKB na C-konci DNA vazebné domény (Obr. 2.4). Toto fosforylační místo pro PKB, je současně vazebným motivem pro 14-3-3 proteiny. Již dříve bylo navrženo, že fosforylace serinového zbytku mezi dvěma částmi této neklasické NLS vede k částečnému narušení její funkce. Navíc vazba 14-3-3 proteinu na FoxO transkripční faktor by mohla stéricky blokovat jednak interakci NLS s jaderným importním systémem tzn. bránit jejich zpětnému importu z cytoplazmy do jádra, tak i interakci DNA-vazebné domény FoxO transkripčních faktorů s DNA. K exportu FoxO proteinů z jádra do cytoplazmy je nutná nejen interakce FoxO transkripčních faktorů se 14-3-3 proteiny, ale také přítomnost NES v sekvenci FoxO transkripčních faktorů, která interaguje s jaderným exportním systémem [23-29].



**Obr. 2.4 Schématické znázornění nejdůležitějších oblastí v primární struktuře FoxO4 [upraveno podle 86].** Z tohoto obrázku je patrné, že oblast DNA-vazebné domény je velice funkční oblastí transkripčního faktoru FoxO4. V okolí fosforylačního místa Ser-193 se nacházejí sekvence aminokyselin, které slouží jako vazebný motiv pro 14-3-3 protein a také jako jaderná lokalizační sekvence (NLS).

V přítomnosti růstových faktorů na povrchu buňky jsou tedy FoxO transkripční faktory fosforylovány, navázány na 14-3-3 a převážně přítomny v cytoplasmě. To znamená, že neprobíhá transkripce genů regulovaných FoxO transkripčními faktory. Navíc během výskytu FoxO proteinů v cytoplasmě může dojít k jejich odbourání ubiquitin – proteazomovým systémem, což spolehlivě zamezí jejich návratu do jádra [30]. Při absenci růstových faktorů, jsou FoxO transkripční faktory lokalizovány převážně v jádře a transkripce genů může úspěšně probíhat.

## 2.2 14-3-3 proteiny

14-3-3 proteiny jsou rodina regulačních proteinů vyskytujících se výhradně v eukaryotických buňkách. Sekvenční analýzou bylo odhaleno, že sekvence kódující 14-3-3 proteiny v organismech - od kvasinek až po člověka – vykazují vysokou podobnost což ukazuje na neobvyklou evoluční konzervovanost této primární struktury. 14-3-3 proteiny samovolně dimerizují za tvorby stabilních homodimerů nebo heterodimerů. Poprvé byly identifikovány jako kyselé proteiny vyskytující se v nadměrném množství v mozkové tkáni. Název 14-3-3 proteinů vyplynul z čísla frakce při separaci proteinů izolovaných z mozkové tkáně chromatografií na DEAE-celulóze a na jejich migrační pozici po elektroforéze na škrobovém gelu [59].

Doposud byly identifikovány dvě izoformy 14-3-3 proteinů vyskytujících se v kvasinkách, sedm u savců (včetně člověka) a více než deset v rostlinách. Všechny izoformy 14-3-3 proteinů mají obdobnou třidimenzionální strukturu. Každý ze dvou monomerů podílející se na tvorbě dimeru se skládá z devíti antiparalelních  $\alpha$ -helixů, které dohromady tvoří „U“ kanál široký přibližně 4 nm. Na každé straně „U“ kanálu se nachází jeden vazebný žlábek obsahující jak kladně tak i záporně nabitě aminokyselinové zbytky. 14-3-3 proteiny hrají důležitou roli v mnoha procesech v buňce od přenosu signálu, přes kontrolu buněčného cyklu, až po apoptózu a karcinogenezi [60-70].

### 2.2.1 Způsob a podmínky interakce 14-3-3 proteinů s jejich vazebnými partnery

14-3-3 proteiny ovlivňují skrze vazebné interakce funkci celé řady proteinů. Ve většině případů musí být vazební partneři 14-3-3 proteinů fosforylováni alespoň na jednom serinovém nebo threoninovém zbytku. Ideální vazebné motivy pro 14-3-3 proteiny jsou RSXpSXP a RXYpSXP, kde X je libovolný aminokyselinový zbytek a pS je fosforylovaný serinový zbytek. Tyto dva motivy jsou sice ideální, ale nejsou nezbytné pro vazbu 14-3-3. Fosforylovaný serinový zbytek může být nahrazen fosforylovaným threoninovým zbytkem. Ale existují i případy, kdy 14-3-3 proteiny efektivně interagují i s nefosforylovanými vazebnými partnery. Všechny polypeptidy obsahující ve struktuře optimální vazebný motiv pro 14-3-3 s nimi interagují prostřednictvím fosforylovaných aminokyselinových zbytků navázaných do postranních vazebných žlábků v „U“ kanálu 14-3-3. Velké množství vazebných partnerů 14-3-3 proteinů obsahuje více než jedno vazebné místo pro 14-3-3 proteiny. Například z krystalové struktury komplexu dimeru 14-3-3 $\zeta$  s N-acetyltransferázou plyne, že efektivní vazba dimeru 14-3-3 na N-acetyltransferázu vyžaduje dvě



vazebná místa v její struktuře. Každý ze dvou fosforylovaných zbytků N-acetyltransferázy se váže do vazebného žlábků na jednom z monomerů tvořící 14-3-3 $\zeta$  dimer [27, 29, 60, 71].

## 2.2.2 Mechanismy funkce 14-3-3 proteinů

14-3-3 proteiny se na molekulární úrovni vyznačují jednou významnou vlastností, která je jakoby předurčuje k tomu být modulátory vlastností svých vazebných partnerů. Molekuly 14-3-3 proteinů jsou obzvláště rigidní díky velkému množství interakcí mezi  $\alpha$ -helixy. Třidimenzionální struktura 14-3-3 proteinů zůstává více méně zachována dokonce i po navázání vazebného partnera. Lze říci, že 14-3-3 proteiny se chovají jako molekulové „kovadliny“ modulující strukturu svých vazebných partnerů. Dosud bylo identifikováno více než sto vazebných partnerů 14-3-3 proteinů, kteří obsahují ve své struktuře alespoň jeden vazebný motiv pro vazbu 14-3-3 proteinů.

Existují tři základní způsoby, kterými 14-3-3 proteiny ovlivňují své vazebné partnery:

1. Navázání 14-3-3 proteinu na vazebného partnera může ovlivnit jeho enzymovou aktivitu. (např. vazba 14-3-3 $\zeta$  na N-acetyltransferázu zvyšuje její enzymatickou aktivitu přibližně o 60%) Krystalická struktura ko-kryystalu 14-3-3 $\zeta$  s N-acetyltransferázou byla uveřejněna v roce 2001 [60]. Navázání 14-3-3 proteinu také může ovlivnit DNA vazebné vlastnosti vazebného partnera [63, 69].
2. Vazba 14-3-3 proteinu může ovlivnit vnitrobuněčnou lokalizaci vazebného partnera. U některých vazebných partnerů vazba 14-3-3 proteinů zvyšuje rychlost jejich importu do jádra, u jiných naopak rychlost exportu z jádra do cytoplazmy. Například při interakci 14-3-3 s FoxO transkripčními faktory dochází k zakrytí NLS a současně patrně k odkrytí NES ve struktuře FoxO proteinů, což vede k jejich rychlému exportu z jádra do cytoplazmy. [26, 63, 72, 73].
3. Vazba 14-3-3 proteinu na dva různé partnery současně může zprostředkovávat jejich vzájemnou efektivní interakci (např. vzájemná interakce Raf1 proteinu s proteinkinázou C) [63].

Obecně lze říci, že funkční efekt navázání 14-3-3 proteinu na vazebného partnera je dán spíše funkcí vazebného partnera v buněčném metabolismu. Mechanismus vazby 14-3-3 je totiž zřejmě víceméně stále stejný.

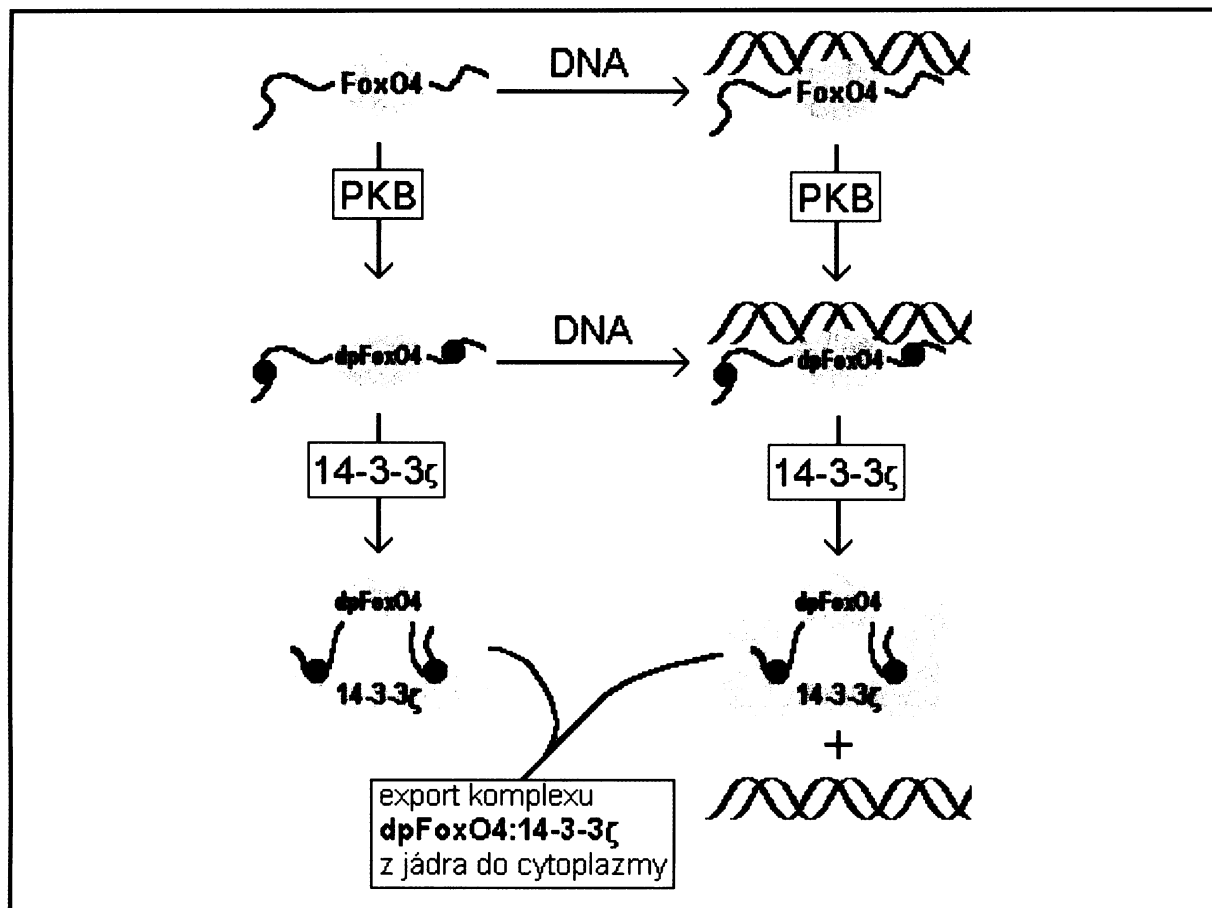
## 2.3 Komplex proteinů 14-3-3 $\zeta$ : FoxO4

**Protein 14-3-3 $\zeta$**  je jedna z nejrošířenějších izoform savčích 14-3-3 proteinů. **FoxO4** (nebo též AFX) je členem skupiny savčích FoxO proteinů. Chromozomální translokace, která vede k fúzi části genu pro transkripční doménu FoxO4 proteinu s genem pro transkripční faktor MLL (mixed-lineage leukemia), hraje pravděpodobně roli při vzniku akutní leukémie [74,75]. Dále se FoxO4 podílí na regulaci buněčného cyklu, přesněji řečeno na uvěznění buňky v G<sub>1</sub> fázi. V roce 2001 byla uveřejněna NMR struktura DNA vazebné domény FoxO4 [76].

FoxO4 obsahuje ve své struktuře tři fosforylační motivy pro proteinkinasy B: threonin 28, serin 193 a serin 258 [1,11,77] (Obr. 2.4). Předchozí studie ukázaly, že fosforylace FoxO4 na těchto místech vede k inhibici transkripční aktivity FoxO4 proteinu a k jeho exportu z jádra do cytoplazmy. Fosforylace FoxO4 však sama o sobě nestačí k inhibici transkripční aktivity FoxO4. Již dříve bylo ukázáno, že pro rychlý export FoxO3a z jádra do cytoplazmy je nezbytná nejen jeho fosforylace a interakce se 14-3-3 proteinem, ale též přítomnost NES v jeho struktuře [17, 26]. Obdobný závěr platí i pro FoxO4. FoxO4 obsahuje ve své struktuře jak nukleární lokalizační sekvenci (NLS), tak i nukleární exportní sekvenci (NES). Pro lokalizaci FoxO4 v jádře se ukázaly být nezbytné aminokyselinové zbytky 180 až 221. FoxO4 obsahuje neklasickou NLS skládající se ze dvou částí, které obklopují fosforylační místo pro PKB na C-konci DNA vazebné domény (serin 193) (Obr. 2.4). Jak již bylo zmíněno dříve, fosforylace serinového zbytku mezi dvěma částmi této neklasické NLS FoxO transkripčních faktorů vede k částečnému narušení její funkce a navíc vazba 14-3-3 proteinu na FoxO transkripční faktor může mít za následek stérickou blokadu této NLS. Podle současných výzkumů to vypadá, že vazba 14-3-3 proteinu ovlivňuje obě části NLS [86]. NES FoxO4 se nachází v úseku mezi 300. až 308. aminokyselinou, který je velmi bohatý na lyzinové zbytky, což odpovídá rozeznávacímu motivu pro nukleární exportní systém [17].

Biofyzikální studie charakterizující interakce mezi FoxO4, 14-3-3 $\zeta$  a fragmentem DNA, jehož sekvence odpovídá sekvenci, na kterou se specificky váží FoxO proteiny *in vivo*, potvrdila, že fosforylace sama o sobě nestačí pro inhibici FoxO4 vazby na DNA. Dále bylo zjištěno, že dva vazebné motivy pro 14-3-3 protein fosforylované proteinkinázou B jsou nezbytné pro efektivní interakci mezi transkripčním faktorem FoxO4 a dimerem 14-3-3 $\zeta$  proteinu. Bylo také prokázáno, že tvorba komplexu dvojnásobně fosforylovaného transkripčního faktoru FoxO4 (dpFoxO4) se 14-3-3 $\zeta$  proteinem má za následek téměř úplnou inhibici DNA vazebných vlastností FoxO4. Dle těchto výsledků lze usuzovat, že interakce FoxO transkripčních faktorů se 14-3-3 proteiny je nejen nezbytná pro jejich rychlý export z jádra do cytoplazmy, ale i pro samotnou inhibici jejich DNA vazebných vlastností.

Přesný molekulární mechanismus této inhibice DNA vazebných vlastností FoxO4 je však stále nejasný [77].



**Obr. 2.5 Vliv fosforylace proteinkinázou B na DNA vazebné vlastnosti FoxO4.**

Obrázek znázorňuje ověřené schéma interakcí FoxO4, 14-3-3 a DNA. Klíčovým poznatkem je za prvé, že pouze fosforylovaný FoxO4 se váže na 14-3-3 protein, a za druhé, že tato vazba způsobí vyvázání FoxO4 z DNA.

### 3 Cíle diplomové práce

Hlavními cíli této diplomové práce jsou:

1. Pomocí cílené mutagenese připravit DNA proteinu FoxO4<sub>11-213</sub> obsahující pouze dva tryptofanové zbytky v DNA-vazebné doméně. Tryptofany Trp-29, Trp-97 a Trp-126 zmutovat na fenylalaniny.
2. Exprimovat mutovanou verzi proteinu FoxO4<sub>11-213</sub> pomocí prokaryotního expresního systému a provést jeho purifikaci.
3. Exprimovat a vypurifikovat 14-3-3 $\zeta$  protein (variantu neobsahující tryptofanové zbytky).
4. Ověřit DNA-vazebné vlastnosti připraveného FoxO4<sub>11-213</sub>.
5. Ověřit vazebné vlastnosti připraveného 14-3-3 $\zeta$ .

## 4 Metody

### 4.1 Cílená bodová mutageneze

Metoda cílené mutageneze umožňuje provádět změny v sekvenci DNA. Pomocí této metody lze v sekvenci DNA nahradit jednotlivé nukleotidy jinými. Rovněž lze nukleotidy přidat či odstranit. Princip spočívá ve vhodném použití polymerázové řetězové reakce (PCR), kde jako primery pro začátek transkripce jsou použity vhodně navržené oligonukleotidy, které korespondují s částí sekvence templátové DNA v místě kde chceme provést mutaci. V sekvenci oligonukleotidu je ovšem zanesena požadovaná změna a tudíž DNA replikovaná na základě těchto oligonukleotidů obsahuje plánovanou mutaci.

Jako templát pro cílenou mutagenezi byla použita cDNA (complementary DNA) pro lidský FoxO4 gen zaklonovaná ve vektoru pGEX-4T-1 (*Amersham Biosciences, Švédsko*) v polyklonovacím místě mezi sekvencemi pro restriční enzymy BamH I a Xho I [76] [příloha 2]. Bodové mutace byly generovány pomocí Quick-Change kitu (*Stratagene, USA*). Přítomnost mutace v sekvenci kódující studovanou oblastí byla ověřena sekvenací. Mutace byly provedeny v následujícím pořadí: tryptofanový zbytek na pozici 97; tryptofanový zbytek na pozici 126; tryptofanový zbytek na pozici 29.

#### 4.1.1 Mutagenezní PCR

Metoda PCR se běžně používá k amplifikaci DNA. Jedná se v zásadě o přirozený proces replikace DNA prováděný *in vitro*. Výchozí směs pro PCR musí obsahovat templátovou DNA, replikační začátek neboli primer, dostatečné množství všech typů volných nukleotidů a termostabilní polymerázu. Celá tato směs prochází při PCR změnou teplotních režimů (viz dále) v určitém počtu cyklů. Tento proces je dnes zcela automatizován a prováděn v PCR přístroji.

Mutagenezní PCR se od běžné PCR liší pouze v tom, že jako primery jsou použity vhodně navržené oligonukleotidy s požadovanou mutací.

V případě, že provádíme několik mutací v jednom úseku DNA je potřeba tyto mutace generovat postupně. Znamená to, že jako templát pro následnou mutagenezi používáme sekvenací ověřenou DNA z předchozí mutageneze (Tab. 4.1).

Mutantní DNA	Použitý templát DNA
FoxO4 <sub>11-213</sub> W97F	FoxO4 <sub>11-213</sub>
FoxO4 <sub>11-213</sub> W97,126F	FoxO4 <sub>11-213</sub> W97F
FoxO4 <sub>11-213</sub> W29,97,126F (=FoxO4 <sub>11-213</sub> fin W)	FoxO4 <sub>11-213</sub> W97,126F

**Tab. 4.1 Připravené mutantní DNA.** V pravém sloupci templátová DNA, použitá při mutagenizní PCR pro přípravu konstruktu uvedeného v levém sloupci. Sekvence DNA pro FoxO4<sub>11-213</sub> je uvedena v příloze 6. **W** odpovídá kodonu pro tryptofan. **F** kodonu pro fenylalanin. Zápis například FoxO4<sub>11-213</sub>W97,126F znamená, že v uvedené DNA byly Trp-97 a Trp-126 zaměněny za Phe-97 a Phe-26.

Pro každou mutaci DNA kódující protein FoxO4<sub>11-213</sub> byla vždy navržena a zakoupena dvojice komplementárních oligonukleotidů obsahující požadovanou změnou (VBC-Genomics, Rakousko) (Tab. 4.2).

sekvence navržená pro mutaci tryptofanového zbytku na pozici 97	
FoxO4 <sub>11-213</sub> W97F I	5' - TCC CGC CGG AAT GCC <b>TTC</b> GGA AAT CAG TCA TAT – 3'
FoxO4 <sub>11-213</sub> W97F II	5' - ATA TGA CTG ATT TCC <b>GAA</b> GGC ATT CCG GCG GGA – 3'
sekvence navržená pro mutaci tryptofanového zbytku na pozici 29	
FoxO4 <sub>11-213</sub> W29,97,126F I	5' - CCC CGC TCC TGC ACC <b>TTC</b> CCC CTC CCC CGA CCA – 3'
FoxO4 <sub>11-213</sub> W29,97,126F II	5' - TGG TCG GGG GAG GGG <b>GAA</b> GGT GCA GGA GCG GGG – 3'

**Tab. 4.2 Příklady navržených oligonukleotidů pro jednotlivé mutace.** Oligonukleotidy pro mutagenizní PCR bývají obvykle navrženy tak, že požadovaná změna je umístěna uprostřed cca 30 bazí dlouhého oligonukletidu. Pro každou mutagenizi je nutné navrhnout primer upstream a downstream.

Pro amplifikaci všech DNA mutantů FoxO4<sub>11-213</sub> byla použita obdobná reakční směs a identický teplotní program (Tab. 4.3).

Složka	Koncentrace složky mol.dm <sup>-3</sup>	Objem μl
10x konc. pufr pro polymerázu Pfu turbo ( <i>Stratogene, USA</i> )	-	5
Templátová DNA pro FoxO4 <sub>11-213</sub> mutanty	4.10 <sup>-8</sup>	1
Oligonukleotid I	1.10 <sup>-7</sup>	5
Oligonukleotid II	1.10 <sup>-7</sup>	5
Směs deoxyribotрифосфонуклеотидů (dNTP)	4.10 <sup>-6</sup>	1
Voda	-	33
Polymeráza Pfu ( <i>Stratogene, USA</i> )	-	1

**Tab. 4.3** Reakční směs pro mutagenezní PCR.

**Složení reakčního pufru (pH 8,8):**

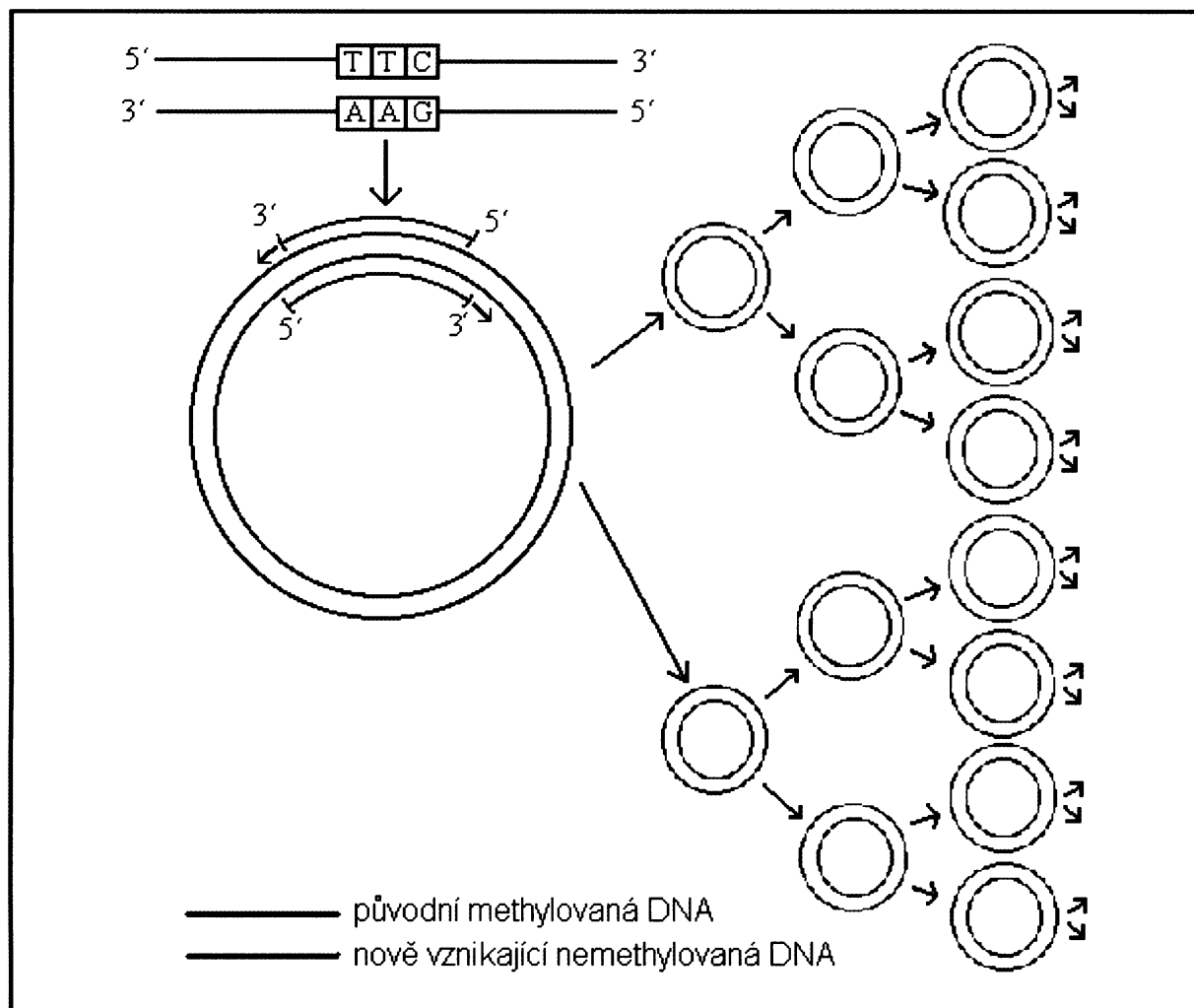
0,1 mol.dm <sup>-3</sup>	KCl
0,1 mol.dm <sup>-3</sup>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
0,2 mol.dm <sup>-3</sup>	Tris-HCl (pH 8,8)
2.10 <sup>-2</sup> mol.dm <sup>-3</sup>	MgSO <sub>4</sub>
1%	Triton X-100
1 g.dm <sup>-3</sup>	BSA

**Teplotní režim:**

95°C 30"	} 20x
51°C 1'	
68°C 12'	
4°C ∞	

Teplotní režim byl naprogramován tak, aby teplota na začátku prudce vzrostla na 95 °C a tam byla udržována 30 sekund. Poté byla teplota postupně snižována na 51°C a na této teplotě udržována jednu minutu. Pak byla teplota zvýšena na 12 minut na 68 °C. Tento cyklus byl opakován 20x.

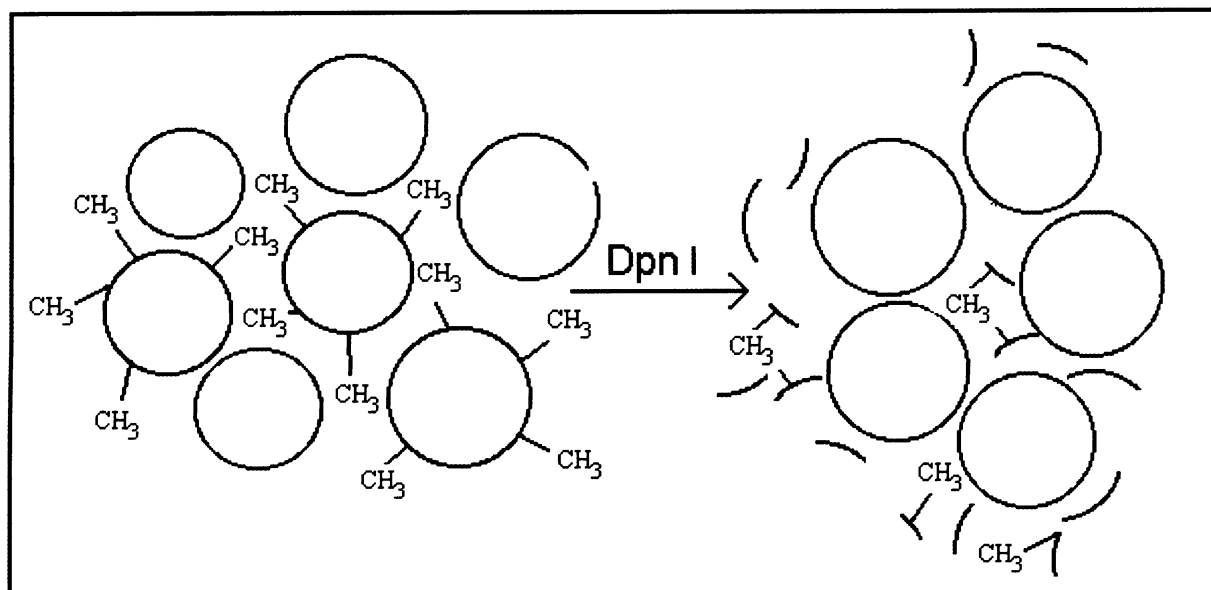
Při teplotě 95°C dochází k rozpojení vláken DNA (denaturaci DNA), teplota 51°C je potřebná k hybridizaci oligonukleotidů s DNA, a při teplotě 68°C dochází k syntéze nového komplementárního vlákna DNA. Syntézu vláken katalyzuje termostabilní DNA polymeráza Pfu turbo. Po dokončení všech 20 cyklů byla směs ochlazená a uchovávána při 4 °C. Celý tento proces byl proveden automaticky na přístroji FT GENE 2D (*Techne, United Kingdom*).



**Obr. 4.1 Vnášení mutace a amplifikace polymerázovou řetězovou reakcí.** Obrázek ukazuje oligonukleotidy navržené pro vnesení mutace, které fungují jako primery při replikaci DNA, a následnou amplifikaci DNA obdobným způsobem. V podstatě jsou zde zobrazeny první čtyři cykly polymerázové řetězové reakce.

Po vyjmutí z přístroje bylo ke směsi přidáno 1,5  $\mu\text{l}$  restrikčního enzymu Dpn I o koncentraci 20 U.  $\mu\text{l}^{-1}$  (New England Biolabs, Kanada) a směs byla dále inkubována dvě hodiny při 37 °C. Dpn I specificky štěpí methylovanou DNA bakteriálního původu, tedy původní templátovou DNA.





**Obr. 4.2 Restrikční štěpení templátu enzymem Dpn I.** Enzym DPN I rozštěpí methylovanou DNA, která představuje původní templátovou DNA. Ta je v tomto okamžiku v roztoku již nežádoucí.

#### 4.1.2 Agarózová elektroforéza DNA

Pro ověření amplifikační reakce byla použita agarózová elektroforéza. V důsledku celkového negativního náboje se DNA pohybuje v elektrickém poli v nedenaturujícím prostředí směrem k anodě a díky charakteru agarózového gelu dochází k rozdělení fragmentů DNA dle velikosti. V tomto případě delší fragmenty DNA migrují gelem pomaleji.

K separaci fragmentů DNA po mutagenezní PCR byl použit 1% agarózový gel. Tento gel byl připraven rozpuštěním 0,45 g agarózy ve 45 ml horkého 1x koncentrovaného TBE pufru.

##### Roztoky:

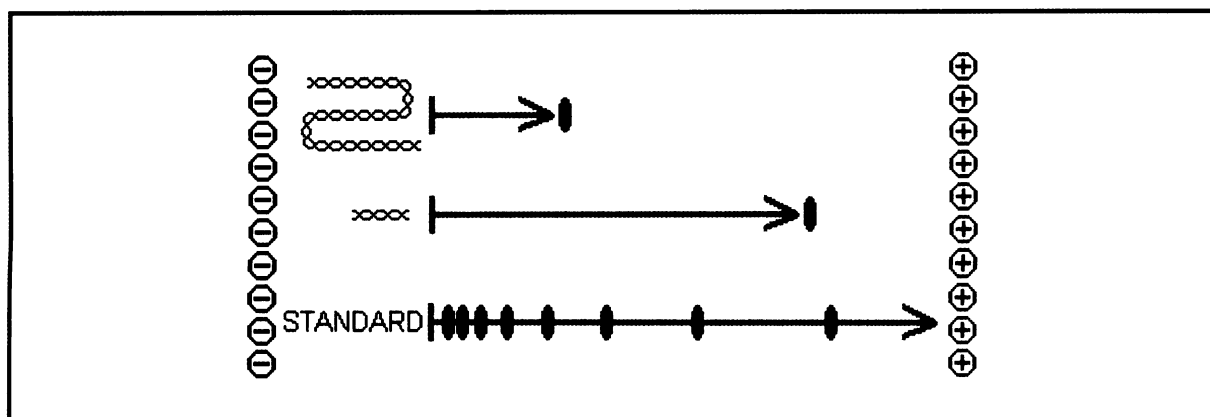
##### 20x koncentrovaný TBE pufr (pH 8,5):

121 g Tris  
 61,7 g kyselina boritá  
 7,44 g EDTA  
 - doplněno vodou do 1 litru

##### Pufr pro přípravu vzorků:

50% glycerol  
 0,5% bromfenolová modř  
 0,5% xylen cyanol

Vzorky byly připraveny smícháním 15  $\mu$ l roztoku amplifikované DNA se 4  $\mu$ l pufru pro přípravu vzorku. Jako standard molekulových hmotností byl použit 1Kb DNA Ladder (*Invitrogen, USA*) [příloha 3] vhodný pro identifikaci fragmentů DNA s velikostí od 500 párů bazí do 12 000 párů bazí.



**Obr. 4.3 Schematické uspořádání agaróзовé elektroforézy DNA.** Schéma zachycuje skutečnost, že při SDS – PAGE putují agaróзовým gelem rychleji kratší úseky DNA. Porovnáním jejich elektromigračních pozic se standardem molekulových hmotností lze zjistit jejich délka.

Do první dráhy bylo vždy naneseno 15  $\mu$ l standardu molekulových hmotností. Elektroforéza byla provedena v horizontální poloze v prostředí TBE pufru po dobu 1 hodiny při napětí 75 V. Po ukončení elektroforézy, byl gel inkubován 1 hodinu v 1% roztoku ethidium bromidu. Mezi molekulami ethidium bromidu a DNA dochází k interakci způsobující fluorescenci, která byla sledována pod UV lampou.

### 4.1.3 Transformace kompetentních buněk *E.coli* JM109

Transformace je proces, při kterém je přenášena cizorodá genetická informace do hostitelské buňky. V zásadě vychází z přirozené vlastnosti bakterií přijímat mikročástice ze svého okolí a replikovat cizorodou DNA společně se svou vlastní. Aby byl tento proces urychlen a usnadněn používá se pro transformaci metoda teplotního šoku.

Tímto způsobem byla zabudována mutantní DNA z právě provedené mutagenese do kompetentních buněk *E.coli* kmene JM109 (*Promega, USA*), což je kmen vhodný pro přípravu DNA pro sekvenování.

#### Roztoky:

##### LB medium dle Luria-Bertani:

- 10 g Bacto trypton
- 5 g Bacto-yeast extract
- 10 g NaCl
- doplněno vodou do 1 litru

##### LB agar (pro přípravu agarových misek):

- 10 g Bacto trypton
- 5 g Bacto-yeast extract
- 10 g NaCl
- 20 g agar
- doplněno vodou do 1 litru

Sterilizace byla provedena v autoklávu při teplotě 121°C po dobu 40 minut. Po sterilizaci byl přidán do obou roztoků 1 ml ampicilinu o koncentraci 100 mg.ml<sup>-1</sup>. LB agar byl nalit na Petriho misky, které byly skladovány při 4 °C.

Transformace bakteriální kultury kompetentních buněk byla provedena pro následný proces biologické amplifikace mutantní DNA. Tímto způsobem byla získána methylovaná mutantní DNA, kterou je možno použít pro další mutagenezi a později odstranit jako nežádoucí templát z roztoku plazmidové DNA.

### **Postup:**

45 µl roztoku bakteriální suspenze bylo smícháno s 1 µl amplifikované mutantní plazmidové DNA po rozštěpení původního templátu enzymem Dpn I. Následovalo 30 minut inkubace při teplotě 0°C. Poté následoval teplotní šok: vzorek byl inkubován 45 sekund na vodní lázni při 42 °C a následně inkubován 2 minuty na ledu. Dále bylo ke vzorku přidáno 450 µl LB media předehřátého na 42°C a vzorek byl inkubován 1 hodinu při 37°C a konstantních otáčkách 190 rpm.

Následně byla celá reakční směs (cca 1ml) nanesena na agarovou misku s ampicilinem a 12 hodin inkubovaná při 37 °C. Agarová miska s narostlými koloniemi pak byla uskladněna při 4 °C.

Komerčně dodávaný plazmid pGEX-4T-1 obsahuje oblast kódující rezistenci na antibiotikum ampicilin. Za přítomnosti ampicilinu v živném mediu se množí tudíž jen ty bakterie, jež byly transformovány tímto plazmidem.

Nakonec byla jedna kolonie z agarové misky přenesena pomocí sterilního očka do 5 ml LB media též obsahujícího ampicilin o koncentraci 100 µg.ml<sup>-1</sup>. Směs byla inkubována 12 hodin při 37 °C při konstantních otáčkách 190 rpm.

## **4.1.4 Izolace plazmidové DNA**

Plazmidová DNA byla z transformované bakteriální kultury izolována metodou „Jetquick Plasmid Miniprep Spin Kit/250“ (*Genomed, USA*). Tato sada obsahuje veškerý potřebný materiál a podrobný navod k provedení izolace. Princip spočívá v centrifugaci buněk při 10 000 G, jejich resuspendaci, lýzi, a odstranění nečistot několikasrokovým srážením, promýváním a centrifugací. Získaná plazmidová DNA byla skladována při teplotě -20°C a část zaslána na sekvenaci (komerční servis, MBÚ AV ČR). Tímto způsobem byla získána DNA kódující všechny tři mutantní proteiny FoxO<sub>4</sub><sup>11-213</sup>.

#### 4.1.5 Transformace kompetentních buněk *E. coli* BL21(DE3)

Kmen kompetentních buněk *E. coli* BL21(DE3) (*Stratagene, USA*) je speciální kmen *E. coli* vhodný pro dlouhodobé uchování a efektivní expresi proteinů. Proto byla výsledná DNA kódující protein FoxO4<sub>11-213</sub> se všemi požadovanými mutacemi (dále jen FoxO4<sub>11-213</sub> fin W) transformována do obou kmenů *E. coli* BL21(DE3) a JM109.

Transformace byla provedena obdobným způsobem jako transformace předešlá, s tím rozdílem, že bylo použito 30  $\mu$ l roztoku bakteriální suspenze *E. coli* BL21(DE3) a později přidáno 300  $\mu$ l LB media.

#### 4.1.6 Příprava glycerolového roztoku bakteriální kultury

Glycerolový roztok bakteriální kultury se používá k dlouhodobému uchování bakteriální kultury při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$ . Glycerol v roztoku minimalizuje vznik ostrých ledových krystalků, které poškozují buněčnou stěnu bakterií.

Bakteriální kultura transformovaná vektorem pGEX-4T-1 obsahujícím DNA kódující protein FoxO4<sub>11-213</sub> fin W byla nanášena na agarovou misku s ampicilinem a 12 hodin inkubovaná při  $37^{\circ}\text{C}$ . Agarová miska s narostlými koloniemi pak byla uskladněna při  $4^{\circ}\text{C}$ . Poté byla jedna kolonie z agarové misky přenesena pomocí sterilního očka do 5 ml LB media též obsahujícího ampicilin o koncentraci  $100\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Směs byla inkubována 12 hodin při  $37^{\circ}\text{C}$  a při konstantních otáčkách 190 rpm. Nakonec byl ke směsi přidán glycerol do finální koncentrace 30%. Následně byla celá směs zamrazena na  $-80^{\circ}\text{C}$  a při této teplotě uchovávána.

## 4.2 Exprese a purifikace proteinu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W

Exprese a purifikace proteinu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W je poměrně náročná vzhledem k malé odolnosti tohoto proteinu k proteolytické degradaci. Aby bylo docíleno dostatečného výtěžku, bylo nutné provádět expresi v poměrně velkém objemu 6 litrů bakteriální kultury, respektive 6x 1 litru LB média. Dále bylo nutné po celou dobu dbát na to, aby byl purifikovaný protein co nejméně zatížen vyššími teplotami. Příponou „fin W“ jsem nazval finální konstrukt proteinu FoxO4<sub>11-213</sub> obsahující záměnu Trp-29,97 a 126 za Phe-29,97 a 126.

### 4.2.1 Exprese rekombinantního proteinu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W

Pro expresi proteinu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W byl použit expresní kmen *E. coli* BL21(DE3) obsahující vektor pGEX-4T-1 s úsekem kódujícím požadovaný protein zaklonovaným v polyklonovacím místě mezi místy pro restriční enzymy BamH I a Xho I [viz příloha 2].

#### Postup:

Ze zásobního glycerolového roztoku bylo odebráno 10  $\mu$ l bakteriální kultury a toto množství bylo přidáno k 5 ml LB média obsahujícího ampicilin o koncentraci 100  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>. Tímto způsobem bylo připraveno 12 x 5 ml LB media a tato kultura byla inkubována 12 hodin při 37 °C a konstantních otáčkách 190 rpm.

10 ml narostlé bakteriální kultury bylo přidáno k 1 litru LB média, kam byl následně přidán ampicilin do celkové koncentrace 100  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>. Celá směs byla inkubována při 37 °C a konstantních otáčkách 190 rpm tak dlouho, dokud absorbance při vlnové délce 600 nm nedosáhla hodnot 0,6 - 1. Absorbance byla měřena na přístroji HP8542 (*Agilent Technologies, USA*). Poté byl do média přidán induktor exprese rekombinantních proteinů IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid), do finální koncentrace 5.10<sup>-4</sup> mol.dm<sup>-3</sup>. Tím byla spuštěna proteosyntéza rekombinantního proteinu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W umístěného ve vektoru pGEX-4T-1. Po přidání IPTG byla bakteriální kultura inkubována 12 hodin při 30 °C a konstantních otáčkách 190 rpm. Poté byla bakteriální kultura centrifugována při 4 °C po dobu 45 minut při konstantních otáčkách 3600 rpm na přístroji Refrigerated centrifuge K80 (*Ependorf, Německo*). Pelet byl dále ihned zpracován.

## 4.2.2 Purifikace rekombinantního proteinu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W

### 4.2.2.1 Sonikace

Sonikace je obvykle prvním krokem purifikace proteinu. Dochází při ní k rozbití buněčných stěn bakterií ultrazvukem. Aby nedošlo k poškození proteinu, je nutné používat pouze omezenou intenzitu ultrazvuku. Stěna bakterií se proto nejprve narušuje chemicky enzymem lysozymem.

#### Roztoky:

##### 10x koncentrovany PBS pufr (pH 7,4):

1,36 mol.dm <sup>-3</sup>	NaCl
2,7.10 <sup>-2</sup> mol.dm <sup>-3</sup>	KCl
5,0.10 <sup>-2</sup> mol.dm <sup>-3</sup>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1,8.10 <sup>-2</sup> mol.dm <sup>-3</sup>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

##### Lyzovací pufr (pH 7,4):

2x koncentrovany	PBS pufr
1.10 <sup>-2</sup> mol.dm <sup>-3</sup>	DTT
1.10 <sup>-3</sup> mol.dm <sup>-3</sup>	EDTA
1.10 <sup>-3</sup> mol.dm <sup>-3</sup>	PMSF

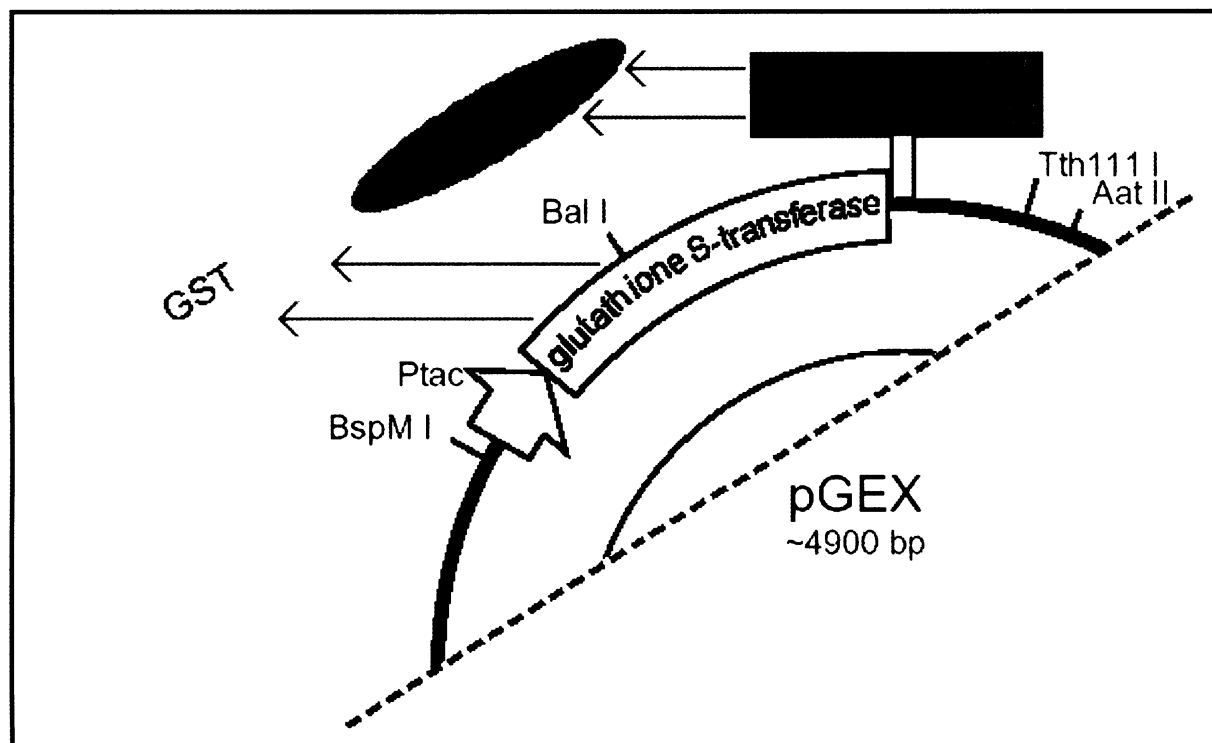
#### Postup:

Pelet získaný centrifugací 1 litru bakteriální kultury byl resuspendován ve 40 ml vychlazeného lyzovacího pufru. Poté byla resuspendovaná bakteriální kultura zmrazena a opět rozmrazena. Před sonikací byl k rozmrazené směsi přidán lysozym, do finální koncentrace 0,1 mg.ml<sup>-1</sup>. Lysozym je enzym, který štěpí peptidoglykany, které tvoří buněčnou stěnu bakterií. Celá směs byla míchána po dobu 30 minut v chladové místnosti při 4 °C. Sonikace byla provedena pěti 60 vteřinovými pulzy při výkonu 35 W na přístroji Nisonix sonicator (*Nisonix Incorporation, USA*). Byla provedena na ledu, protože směs se při sonikaci zahřívá a mohlo by docházet k denaturaci proteinu. Po sonikaci byla bakteriální suspenze centrifugována po dobu 45 minut při 13500 rpm na přístroji Biofuge 28RS (*Heraeus Sepatech, Německo*). Získaný supernatant obsahující proteinovou frakci uvolněnou z rozbitých buněk byl uchováván při teplotě -80 °C.

### 4.2.2.2 GST afinitní chromatografie

Proteiny exprimované pomocí plazmidu pGEX-4T-1 jsou exprimovány jako fúzní proteiny s navázanou glutathion-S-transferázou (GST) na jejich N-konci. Ta slouží jako afinitní kotva při GST afinitní chromatografii. Využívá se při tom afinitu GST ke speciálně připravené matici – GLU-SEPHAROSE<sup>TM</sup> Fast Flow (*Amersham Biosciences, Švédsko*). Komplex GST:protein se na matici naváže, zatímco ostatní proteiny jsou ze směsi eluovány vhodným pufrům. Následně je matrice promývána

silným roztokem redukovaného glutathionu, který má ke GST větší afinitu než glutathion navázaný na matici. Tímto způsobem je komplex GST:protein z matrice uvolněn.



**Obr. 4.4** Expres komplexu GST:FoxO4. Protein FoxO4<sub>11-213</sub> fin W byl exprimován jako fúzní protein s navázanou GST afinitní kotvou. Tato afinitní kotva má přibližně stejnou molekulovou hmotnost jako FoxO4<sub>11-213</sub> fin W a exprimuje se na jeho N-konci.

#### Roztoky:

##### Pufr pro eluci glutathionem (pH 7,5):

2,0 · 10<sup>-2</sup> mol · dm<sup>-3</sup> Tris HCl pH 7,5  
 0,5 mol · dm<sup>-3</sup> NaCl  
 1,0 · 10<sup>-3</sup> mol · dm<sup>-3</sup> EDTA  
 1,0 · 10<sup>-2</sup> mol · dm<sup>-3</sup> DTT  
 10% glycerol  
 -doplněno vodou do objemu 1 litru

##### 10mM glutathion (pH 8):

0,31 g redukovaný glutathion  
 - doplněno pufrem pro eluci do objemu 100 ml  
 - pH upraveno na 8

#### Postup:

Běžně užívaná chromatografická kolona byla naplněna matricí GLU-SEPHAROSE™ Fast Flow (Amersham Biosciences, Švédsko). Dále byla promyta 250 ml pufru pro eluci glutathionem. K takto připravené matrici byla přidána proteinová frakce a směs byla inkubována 1 hod při teplotě 4°C. Poté byla

směs nanesena na běžnou chromatografickou kolonou napojenou na peristaltickou pumpu. Po zachycení veškeré směsi byla matrice s navázaným komplexem GST:protein promyta 300 ml pufru pro eluci glutathionem. Následně byla směs v koloně promyta 60 ml roztoku redukovaného glutathionu a jímány proteinové frakce po 5 ml.

#### 4.2.2.3 Specifické štěpení TEV proteázou

TEV proteáza (proteáza virů tabákové mozaiky, Tobacco Etch Virus [88]) je enzym, který specificky odštěpí z proteinu GST. Pro použití správného množství TEV proteázy je nutné zjistit přibližnou stávající koncentraci proteinu v roztoku. Pro toto zjištění bylo použito Lambertova-Bearova zákona ( $A = \epsilon \cdot c \cdot l$ ), kde  $A$  je absorbance roztoku,  $\epsilon$  je absorpční koeficient purifikovaného proteinu v současném stavu, tedy i s navázaným GST, a  $l$  je optická dráha. Absorbance byla měřena při vlnové délce 280 nm na přístroji SPEKTROFOTOMETR CECIL CE 8020 s použitím křemenné kyvety s tloušťkou 1 cm. Absorpční koeficient byl vypočítán pomocí „ProtParam tool“ volně přístupného na [www.expasy.org](http://www.expasy.org).

Následně bylo přidáno patřičné množství TEV proteázy a vzorek byl inkubován po dobu 80 minut při 37°C a konstantních otáčkách 190 rpm.

TEV proteáza byla poskytnuta RNDr. Veronikou Obšilovou PhD. společně s informacemi o koncentraci a specifické aktivitě. Koncentrace TEV proteázy byla 200 U.ml<sup>-1</sup>, specifická aktivita byla 250 U.mg<sup>-1</sup>

#### 4.2.2.4 Dialýza

Dialýza je separační metoda, která se používá k odstranění nízkomolekulárních látek z roztoků proteinů, nebo též ke změně složení roztoku, ve kterém je protein rozpuštěn. Dialyzační střevo je membrána s vhodnou velikostí pórů. Membrána je nepropustná pro vysokomolekulární látky a současně propustná pro nízkomolekulární látky. Nízkomolekulární látky se pohybují přes membránu ve směru klesajícího koncentračního gradientu.

Proteinové frakce se po jednotlivých purifikačních krocích dialyzují z toho důvodu, že pro další purifikační krok nebo pro další experimenty je nezbytná změna složení pufru, ve kterém je protein rozpuštěn. Pro další purifikační krok, kationtovou výměnnou chromatografií, bylo nutné vzorek dialyzovat 12 hodin v pufru E (složení viz dále).



**Membrána použitá pro dialýzu:** MCO 14 000 („Molecular weight Cut off“ 14 000 = membrána nepropustná pro molekuly s  $M_r > 14\,000$ ) (Roth, Německo) (Relativní molekulová hmotnost mutantního proteinu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W je 22 320.).

#### 4.2.2.5 Kationtově výměnná chromatografie

Kationtově výměnná chromatografie je metoda, která se obecně používá k separaci částic nesoucích kladný náboj. Transkripční faktor FoxO4 má v roztoku o neutrálním pH kladný náboj (teoretický  $pI_{\text{FoxO4}_{11-213}} \text{ fin W} = \text{cca } 9,6$ ), podobně jako všechny DNA vazebné proteiny. DNA je díky fosfátovým skupinám na svém povrchu nabitá negativně. Podstatou separace je elektrostatická interakce kladně nabitých částic s negativně nabitou maticí, kterou je naplněna chromatografická kolona. Na matici dochází k výměně kationtů  $\text{Ni}^{2+}$  za proteiny nesoucí kladný náboj, jež se na ní za daných podmínek váží silnějšími elektrostatickými interakcemi. Následná eluce je prováděna pufrům se vzrůstajícím gradientem iontové síly.

#### Roztoky:

##### Hnací pufr (E):

$5,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  kyselina citrónová  
 $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  EDTA  
 $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  DTT  
- upraveno na pH 6,3

##### Eluční pufr (F):

složení pufru E +  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  NaCl  
- upraveno na pH 6,3

Pro purifikaci proteinu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W byla použita kolona naplněná Butyl-S-Sepharózou (Amersham Biosciences, Švédsko) obsahující negativně nabitou skupinu  $\text{SO}^{3-}$ . Kolona byla připojena k přístroji „ÄKTAprime™“ (Amersham Biosciences, Švédsko) pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) a data byla analyzována pomocí programu „Unicorn 4.11“ dodaným spolu s přístrojem.

#### Metoda:

Teplota.....  $4^\circ \text{C}$

Průtoková rychlost.....  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Koncentrační gradient..... 0-100% (Lineární gradient NaCl byl tvořen automatizovaným směřováním pufrů E a F, přičemž 0% odpovídá složení pufru E a naopak 100% odpovídá složení pufru F)

Maximální tlak v koloně...  $0,9 \text{ Mpa}$

- Frakce byly sbírány po 0,5 ml do 1,5 ml plastových mini zkumavek.
- Absorbance eluovaného vzorku byla měřena při vlnové délce 280 nm, což odpovídá absorpčnímu maximu proteinů.

#### **Postup:**

Nejprve byla kolona promývána 10 minut pufrům E při průtokové rychlosti 2 ml.min<sup>-1</sup>. Následovala ekvilibrace kolony pufrům E při průtokové rychlosti 1 ml.min<sup>-1</sup> až do ustálení vodivosti eluovaného roztoku. V dalším kroku byl nanášen vzorek na kolonu po 2 ml roztoku proteinu. V jednom cyklu bylo nanášeno maximálně 10 ml roztoku proteinu. Po nanesení vzorku na kolonu následovala eluce koncentračním gradientem (viz metoda). V okamžiku, kdy eluční křivka jasně ukazovala, že již došlo k vyloučení proteinu z kolony, byla eluce manuálně ukončena.

Čistota proteinových frakcí získaných po výměnné kationtové chromatografii, byla analyzována metodou SDS-PAGE (viz dále). Frakce obsahující mutantní protein byly sloučeny a v dalším postupu zkoncentrovány.

#### **4.2.2.6 Zkoncentrování roztoků proteinů**

Při každém purifikačním kroku dochází k naředění roztoku proteinu, a to jak během samotné purifikace, tak i během následné dialýzy. Aby byla purifikace co nejúčinnější, je zapotřebí protein mezi purifikačními kroky zkoncentrovat. Také po ukončení purifikace je nezbytné zvýšit koncentraci proteinu, neboť vyšší proteinová koncentrace je výhodná pro další experimenty.

Pro zkoncentrování se používají koncentrátoři skládající se ze dvou částí: horní částí je zkumavka o objemu 4 ml, na jejímž dně je umístěná celulosová ultracentrifugační membrána propustná pro molekuly o určité velikosti. Dolní část tvoří sběrná zkumavka o objemu 3 ml, do které se jímá roztok, který během centrifugace projde přes membránu.

Pro zkoncentrování proteinů byly použity koncentrátoři s MCO 10000 (*Amicon, USA*). Centrifugace byla prováděna na přístroji High Speed Brushless Centrifuge MPW 350R, Angel Rotor (*MPW MED INSTRUMENTS, Polsko*) při 4°C a otáčkách 3 000 rpm. Roztok proteinu byl nanášen na koncentrátor, dokud nebylo dosaženo snížení objemu vzorku v centrikolonci na 1 ml, což je objem vhodný pro následný purifikační krok, jímž byla gelová filtrace.

#### 4.2.2.7 Gelová filtrace

Gelová filtrace je metoda, při které jsou molekuly separovány na základě své velikosti (molekulární hmotnosti) a tvaru. Náplň chromatografické kolony tvoří gel obsahující pórovité částice. Molekuly, jejichž průřez je menší než průřez pórů gelových částic, vstupují do gelových částic a jejich pohyb kolonou je zpomalován oproti pohybu mobilní fáze. Molekuly, které jsou větší než póry v gelových částicích, s náplní kolony neinteragují. Obecně platí, že velké molekuly jsou v porovnání s malými molekulami eluovány rychleji.

##### **Roztok:**

##### **Eluční pufr (Ph 7,5):**

$2,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.dm}^{-3}$	Tris HCl (pH 7,5)
$1 \cdot 10^{-1} \text{ mol.dm}^{-3}$	NaCl
$2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$	DTT
$1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$	EDTA
10%	glycerol

Pro gelovou filtraci byla použita kolona „Superdex™ 75“ (Amersham Biosciences, Švédsko). K tomuto purifikačnímu kroku byl rovněž použit přístroj „ÄKTAprime™“ (Amersham Biosciences, Švédsko) pro HPLC a program Unicorn 4.11 pro řízení a vyhodnocení celého procesu.

Z předchozího kroku „zakoncentrování roztoků“ bylo získáno 2x 1 ml roztoku proteinu. Tyto roztoky nebyly spojeny, naopak byly na kolonu nanесeny každý zvlášť, tedy ve dvou běžích.

##### **Metoda:**

Teplota.....4 °C  
Průtoková rychlost.....0,7 ml.min<sup>-1</sup>

- Frakce byly sbírány po 0,5 ml do 1,5 ml plastových mini zkumavek.
- Absorbance eluovaného roztoku byla měřena při vlnové délce 280 nm, což odpovídá absorpčnímu maximu proteinů.

##### **Postup:**

Nejprve byl systém bez kolony promýván 20 minut elučním pufrém při průtokové rychlosti 3 ml.min<sup>-1</sup>. Následovala ekvilibrace kolony elučním pufrém při průtokové rychlosti 0,5 ml.min<sup>-1</sup> až do ustálení vodivosti eluovaného roztoku. V dalším kroku byl nanесen celý objem zakoncentrovaného roztoku proteinu z jedné centrikolonky. Po nanесení vzorku na kolonu následovala eluce elučním pufrém (viz

metoda). V okamžiku, kdy eluční křivka jasně ukazovala, že již došlo k vyloučení proteinu z kolony byla eluce manuálně ukončena.

Čistota proteinových frakcí získaných po gelové filtraci, byla analyzována metodou SDS-PAGE (viz. dále). Frakce obsahující mutantní protein byly uskladněny při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$ , připraveny k ověření DNA vazebných vlastností purifikovaného proteinu.

#### 4.2.2.8 SDS-PAGE

SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoreses) je metoda, která se používá k analýze a vizualizaci proteinového složení vzorku. Účinkem SDS proteiny denaturují a získávají jednotný záporný náboj a tyčinkovitý tvar. Díky tomu, že v prostředí SDS mají všechny molekuly proteinů jednotný náboj, při průchodu proudem roztokem se všechny pohybují směrem k anodě. Polyakrylamidový gel obsahuje ve své struktuře póry, jejichž velikost je srovnatelná s velikostí proteinů. Molekuly proteinů jsou tak separovány na principu „molekulového síta“ v závislosti na své velikosti, neboli molekulové hmotnosti. Malé proteiny se pohybují polyakrylamidovým gelem rychleji než velké proteiny.

Pro separaci proteinů byl použit 12% separační gel v kombinaci se zaváděcím gelem. 12% gel se používá k separaci fragmentů o molekulové hmotnosti 15 000 – 60 000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

##### Roztoky pro přípravu gelů:

###### **Pufř pro separační gel (pH 8,8):**

75 ml 2  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  Tris-HCl (pH 8,8)  
4 ml 10% SDS  
21 ml voda

###### **Pufř pro zaváděcí gel (pH 6,8):**

50 ml 1  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  Tris-HCl (pH 6,8)  
4 ml 10% SDS  
46 ml voda

###### **10x koncentrovaný TBE pufř:**

50 g Tris-HCl  
144 g glycinu  
10 g SDS  
- doplněno vodou do 1 litru

###### **30% Akrylamid:**

29,2% Akrylamid  
0,8% Bis-acrylamid  
voda

###### **Pufř pro přípravu vzorků (pH 6,8):**

0,6 ml 1  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  Tris-HCl (pH 6,8)  
5 ml 50% glycerolu  
2 ml 10% SDS  
0,5 ml  $\beta$ -merkapt ethanol  
1 ml 1% bromfenolové modři  
0,9 ml voda

## Roztoky pro vizualizaci proteinů:

### Barvicí roztok:

1g „Coomasie Blue“ R-250  
450 ml methanolu  
450 ml voda  
100 ml koncentrované kyseliny octové

### Odbarvovací roztok:

100 ml methanolu  
100 ml koncentrované kyseliny octové  
800 ml voda

12% gel na SDS PAGE		
	separční gel	zaváděcí gel
akrylamid	3 ml	0,25 ml
Pufř + SDS	2 ml	0,5 ml
voda	2,6 ml	1,1 ml
persulfát	50 $\mu$ l	25 $\mu$ l
TEMED	7,5 $\mu$ l	4 $\mu$ l

**Tab. 4.4 Složení 12 % gelu pro SDS – PAGE**

Vzorek nanášený na gel obsahoval 5 – 10  $\mu$ l frakce a 5  $\mu$ l pufru pro přípravu vzorků. Celá směs byla vařena na vodní lázni po dobu jedné minuty. Účinkem zvýšené teploty, SDS a  $\beta$ -merkaptoethanolu, který redukuje disulfidické můstky v proteinech, došlo k denaturaci vzorku. Takto připravené vzorky byly nanášeny do vzorkovacích jamek v zaváděcím gelu. Do první jamky bylo nanášeno 10  $\mu$ l standardu molekulových hmotností.

Jako standardy molekulových hmotností byly používány „MIX 4“ a „MIX 5“. Mix 4 obsahuje směs proteinů o relativních molekulových hmotnostech 97 000, 67 000, 45 000 a 29 000 a byl používán k identifikaci proteinu před tím, než z něj byla odštěpena GST. Mix 5 obsahuje směs proteinů o relativních molekulových hmotnostech: 29 000, 21 000, 12 500 a 6 500 a byl používán k identifikaci proteinu s již odštěpenou GST. Elektroforéza byla prováděna ve vertikální poloze po dobu 45 – 50 minut při napětí 200 V.

Po skončení elektroforézy byly separované proteiny vizualizovány ponořením gelu do barvicího roztoku na 30 minut. Barvicí roztok obsahující Coomasie blue R250 se naváže na protein obsažený v gelu a dojde k jeho ukotvení v gelu. Po obarvení byl gel ponořen na jednu hodinu do odbarvovacího roztoku. Po tomto kroku zůstala v gelu obarvena pouze ta místa, ve kterých byly navázané proteiny.

### 4.2.3 Fosforylace FoxO4<sub>11-213</sub> fin W

Fosforylace je reakce, při které je fosfátová skupina ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) připojena k organické molekule. V našem případě se fosfátová skupina navázala na specifické aminokyselinové zbytky – Thr-28 a Ser-193, v sekvenci FoxO4<sub>11-213</sub> fin W. Zdrojem fosfátových skupin jsou molekuly ATP a fosforylace je katalyzována specifickými enzymy – kinázami. V tomto případě byla použita PKB $\alpha$  (*Upsate, USA*), o specifické aktivitě 579 U.mg<sup>-1</sup> a koncentraci 0,4 mg.ml<sup>-1</sup>. Množství použité kinázy se teoreticky řídí vztahem:

„1 jednotka (Unit) aktivity PKB $\alpha$  odpovídá 1 nmol fosfátu navázaného na modelový peptid „Crossitite“ o koncentraci 30  $\mu\text{M}$  za jednu minutu při 30°C a v přítomnosti 100  $\mu\text{M}$  ATP“

, ve skutečnosti ovšem nelze přesně určit čas, po který je PKB $\alpha$  funkční a použité množství se řídí odhadem.

**Tab.4.5 Složení vzorků pro fosforylaci mutantního proteinu FoxO<sub>11-213</sub> fin W**

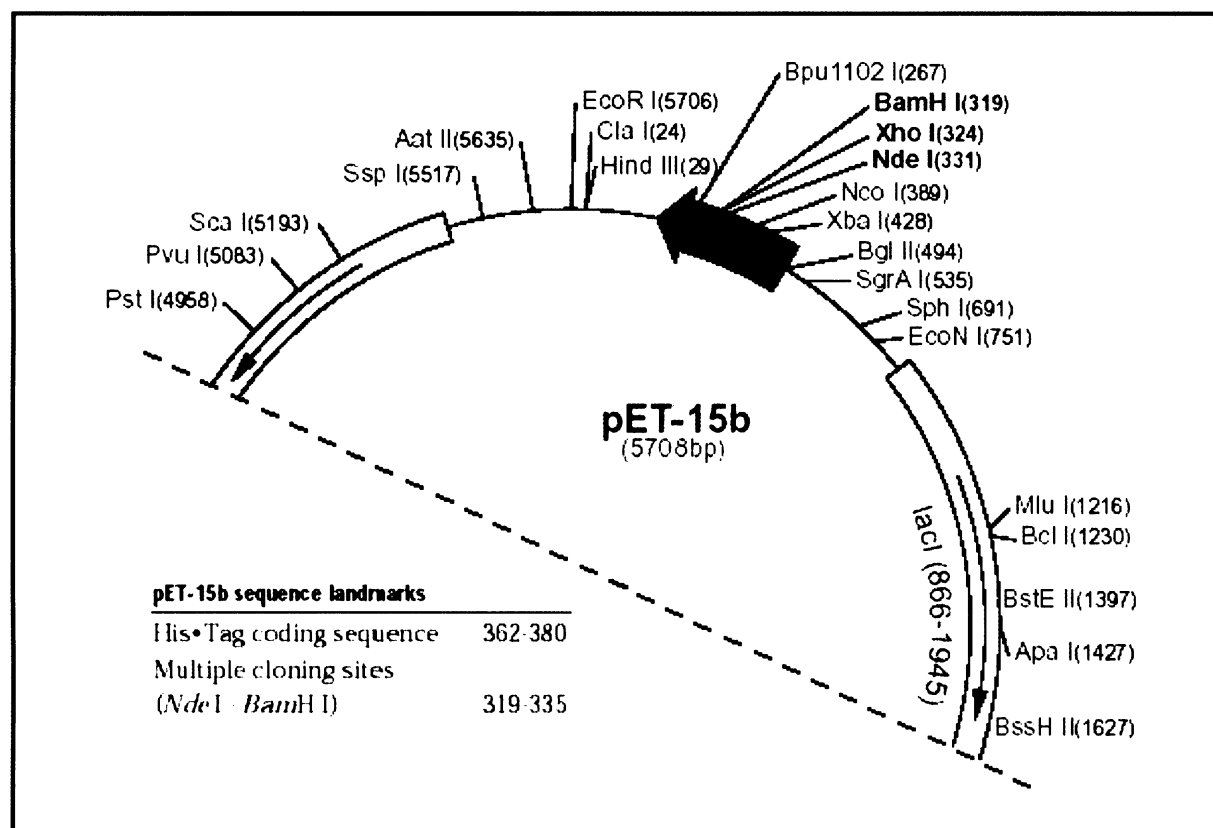
Složka	Složení fosforylovaného vzorku	Složení referentního vzorku
ATP	$0,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol. dm}^{-3}$	$0,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol. dm}^{-3}$
Mg <sup>2+</sup>	$1 \cdot 10^{-2} \text{ mol. dm}^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2} \text{ mol. dm}^{-3}$
PKB $\alpha$	0,4 mg.ml <sup>-1</sup>	-
Mutant FoxO4 <sub>11-213</sub> fin W	$14,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol. dm}^{-3}$	$14,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol. dm}^{-3}$

Na fosforylaci bylo použito polovina vypurifikovaného množství proteinu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W. Vzorky byly inkubovány 2 hodiny při 30 °C. Po jedné hodině byl přidán stejný objem ATP jako byl na počátku použit pro přípravu vzorku. Vzorky byly další hodinu inkubovány při 30°C. Oba vzorky byly poté dialyzovány 48 hodin při 4°C proti roztoku o složení:  $2,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol. dm}^{-3}$  TrisHCl (pH 7,5)  
 $1,0 \cdot 10^{-1} \text{ mol. dm}^{-3}$  NaCl,  
 $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol. dm}^{-3}$  EDTA.

## 4.3 Exprese a purifikace proteinu 14-3-3 $\zeta$ no W

### 4.3.1 Exprese proteinu 14-3-3 $\zeta$ no W

Protein 14-3-3 $\zeta$  no W byl exprimován jako fúzní protein s afinitní kotvou tvořenou řetězcem šesti histidinů (His-Tag). Pro expresi 14-3-3 $\zeta$  no W byl použit expresní kmen *E. coli* BL21(DE3) obsahující vektor pET15b (Novagen, USA) [viz příloha 4] s úsekem kódujícím protein 14-3-3 no W zaklonovaným v polyklonovacím místě mezi místy pro restriční enzymy Nde I a BamH I. Postup exprese proteinu 14-3-3 $\zeta$  no W byl shodný s postupem při expresi FoxO4<sub>11-213</sub> fin W (viz kapitola 4.2.1). Také příprava bakteriálního lyzátu byla prováděna stejným způsobem jako při purifikaci FoxO4<sub>11-213</sub> fin W (viz kapitola 4.2.2.1).



**Obr. 4.5 Umístění polyklonovacích míst Nde I, BamH I a sekvence His-Tag ve vektoru pET-15b.** Část mapy vektoru pET-15b. Tučně jsou zvýrazněna pro nás podstatná polyklonovací místa NDE I a BamH I. V levé dolní části obrázku jsou popsány pozice, ve kterých se tato místa nacházejí. Dále je tam uvedena pozice sekvence His-Tag. Celá mapa tohoto vektoru je v příloze 4.

## 4.3.2 Purifikace proteinu 14-3-3ζ no W

### 4.3.2.1 Niklová chelatační chromatografie

Histidin tvoří stabilní komplex s nikelnatým kationtem, a proto fúzní proteiny obsahující na C-konci řetězec šesti histidinů jsou schopny se s vysokou afinitou specificky vázat na niklovou sepharozovou matici. Nenavázané proteiny, nespecificky navázané proteiny obsahující histidinové zbytky a následně specificky navázané proteiny obsahující His-Tag jsou eluovány koncentračním gradientem roztoku imidazolu vytvořeným směřováním pufru E a pufru F (složení viz dále).

#### Roztoky:

##### Roztok NiSO<sub>4</sub>:

0,1 mol.dm<sup>-3</sup> NiSO<sub>4</sub>

##### Regenerační roztok:

1.10<sup>-1</sup> mol.dm<sup>-3</sup> EDTA

0,5 mol.dm<sup>-3</sup> NaCl

##### Hnací pufr (E):

1x PBS

0,5 M NaCl

2 mM β - ME

1 mM imidazol

##### Eluční pufr (F):

složení pufru E + 0,6 mol.dm<sup>-3</sup> imidazol

Pro purifikaci niklovou afinitní chromatografií byla použita kolona pro HPLC naplněná 5 ml chelatační sepharozou fast flow (*Amersha Bioscience, Švédsko*). Kolona byla připojena k přístroji „ÄKTAprime™“ (*Amersham Biosciences, Švédsko*) pro vysokoúčinnou kapalinovou a data byla analyzována pomocí programu „Unicorn 4.11“ dodaného spolu s přístrojem. Protein byl eluován koncentračním gradientem roztoku imidazolu.

#### Metoda:

Teplota..... 4° C

Průtoková rychlost..... 1 ml.min<sup>-1</sup>

Koncentrační gradient..... 0 -100% (Gradient imidazolu byl tvořen automatizovaným směšováním pufrů E a F, přičemž 0% odpovídá složení pufru E a naopak 100% odpovídá složení pufru F)

Maximální tlak v koloně..... 0,9 Mpa

- Frakce byly sbírány po 0,5 ml do 1,5 ml plastových zkumavek.
- Absorbance eluovaného vzorku byla měřena při 280 nm, což odpovídá absorpčnímu maximu proteinů.



## Postup:

Kolona pro niklovou afinitní chromatografii byla nejprve regenerována 30 ml regeneračního roztoku a 20 ml vody. Následovalo promytí kolony 50 ml 0,1 M roztoku  $\text{NiSO}_4$  (navázání  $\text{Ni}^{2+}$  na sepharozu) a opět propláchnutí 10 ml vody. Poté byla kolona připojena k přístroji pro HPLC a systém ekvilibrován pufrům E při průtoku  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Poté byl na kolonu nanášen roztok proteinu po 2 ml za stejné rychlosti průtoku pufru E. Následovala eluce koncentračním gradientem imidazolu vytvořeným směřováním pufru E a pufru F při průtoku  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Tím byly z roztoku odstraněny nenavázané proteiny, dále při silnější koncentraci imidazolu, nespecificky navázané proteiny a při ještě vyšší koncentraci imidazolu specificky navázaný protein 14-3-3 $\zeta$  no W. Když eluční křivka jasně ukazovala, že došlo k eluci celého množství proteinu 14-3-3 no W byl proces manuálně ukončen.

Čistota proteinových frakcí získaných při niklové afinitní chromatografii byla analyzována metodou SDS-PAGE (viz kapitola 4.2.2.8). Frakce obsahující mutantní protein byly sloučeny a 12 hodin dialyzovány proti roztoku His-buffer II (postup viz kapitola 4.2.2.4).

## Dialyzační roztok:

### His-buffer II:

$2,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	Tris HCl pH 7,5
$1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	EDTA
$1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	DTT
10%	glycerol

### 4.3.2.2 Thrombinové štěpení

Enzym thrombin se používá ke specifickému odštěpení histidinové afinitní kotvy. Pro správné určení množství použitého thrombinu bylo opět nutné zjistit stávající koncentraci roztoku proteinu s použitím „ProtParamTool“ volně přístupného na [www.expasy.org](http://www.expasy.org) pro zjištění absorpčního koeficientu proteinu 14-3-3 $\zeta$  no W (+ HisTag) a změřit absorbanci na přístroji Spectrofotometr Cecil CE 8020 s použitím křemenné kyvety s optickou dráhou 1 cm.

V našem případě byl použit thrombin o koncentraci  $1 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  a specifické aktivitě  $5 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  (Sigma-Aldrich, USA).

Po stanovení množství thrombinu byl enzym přidán k roztoku proteinu a směs byla inkubována 12 hodin při  $4^\circ\text{C}$ .

### 4.3.2.3 Aniontově výměnná chromatografie

Aniontově výměnná chromatografie je metoda, která se obecně používá k separaci částic nesoucích záporný náboj. Protein 14-3-3 $\zeta$  no W má v roztoku o pH 8 (pH při kterém byla tato chromatografie prováděna) záporný náboj (teoretický pI<sub>14-3-3 no W</sub> = 4,7). Podstatou separace je elektrostatická interakce záporně nabitých částic s kladně nabitou sepharozovou maticí, kterou je naplněná chromatografická kolona. Následná eluce je prováděna pufrem se vzrůstajícím gradientem iontové síly.

#### Roztoky:

##### Hnací pufr (E) (pH 8):

$5,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 8  
 $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$  EDTA  
 $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$  DTT  
10% glycerol

##### Eluční pufr (F) (pH 8):

složení pufru E +  $1 \text{ mol.dm}^{-3}$  NaCl

Pro purifikaci proteinu 14-3-3 $\zeta$  no W byla použita kolona tricon 5/50 (Amersham Biosciences, Švédsko) naplněná Q-sepharozou pro aniontovou výměnu (Amersham Biosciences, Švédsko). Kolona byla připojena k přístroji „ÄKTAprime™“ (Amersham Biosciences, Švédsko) pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) a data byla analyzována pomocí programu „Unicorn 4.11“ dodaným spolu s přístrojem.

#### Metoda:

Teplota.....4° C

Průtoková rychlost.....1 ml.min<sup>-1</sup>

Koncentrační gradient..... 0 -100% (Lineární gradient NaCl byl tvořen automatizovaným směřováním pufrů E a F, přičemž 0% odpovídá složení pufru E a naopak 100% odpovídá složení pufru F)

Maximální tlak v koloně.....0,9 Mpa

- Frakce byly jímány po 0,5 ml do 1,5 ml plastových mini zkumavek.
- Absorbance eluovaného vzorku byla měřena při 280 nm, což odpovídá absorpčnímu maximu proteinů.

**Postup:**

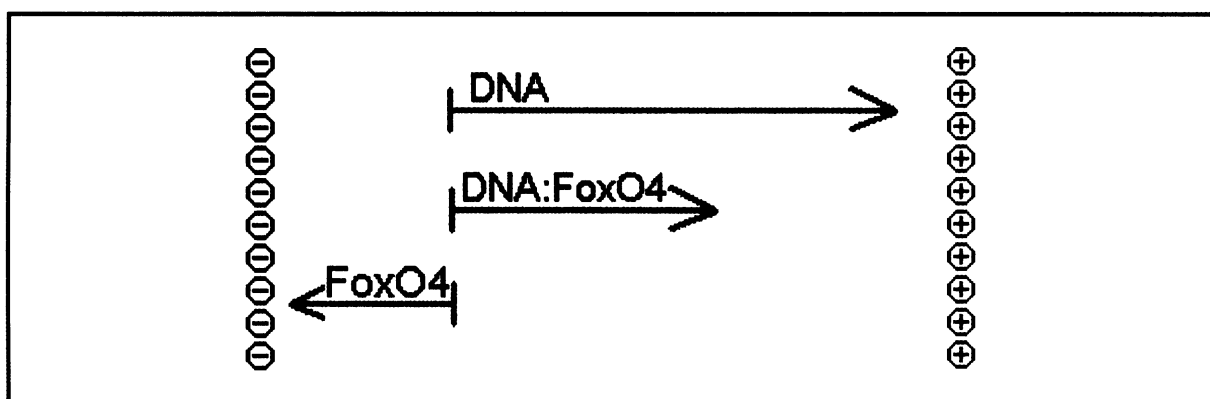
Nejprve byla kolona promývána 10 minut puřrem E při řrůtokové rychlosti 2 ml.min<sup>-1</sup>. Následovala ekvilibrace kolony puřrem E při řrůtokové rychlosti 1 ml.min<sup>-1</sup> až do ustálení vodivosti eluovaného roztoku. V dalřím kroku byl nanářen vzorek na kolonu po 2 ml roztoku proteinu. V jednom cyklu bylo nanářeno maximálně 10 ml roztoku proteinu. Po nanesení vzorku na kolonu následovala eluce koncentračním gradientem NaCl (viz metoda). V momentě, kdy eluční křivka jasně ukazovala, že již dořlo k vyloučení proteinu z kolony byla eluce manuálně ukončena.

Čistota proteinových frakcí získaných po výměnné aniontové chromatografii, byla analyzována metodou SDS-PAGE (viz kapitola 4.2.2.8). Vybrané frakce byly sloučeny a 12 hodin dialyzovány proti roztoku His-buffer II (složení viz kapitola 4.3.2.1, postup viz kapitola 4.2.2.4) .

## 4.4 Ověření vazebných vlastností připravených proteinů

### 4.4.1 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) je metoda, která se používá při studiu interakcí mezi DNA a kladně nabitým proteinem. Princip metody spočívá v tom, že komplex DNA:protein se pohybuje polyakrylamidovým gelem v nedenaturující prostředí pomaleji než volná DNA. V nedenaturujícím prostředí má DNA záporný náboj a tudíž putuje k anodě. V komplexu DNA:protein převažuje též záporný náboj, také putuje k anodě, ovšem vzhledem ke své velikosti menší rychlostí než samotná DNA. Samotný kladně nabitý protein se pohybuje ke katodě.



**Obr. 4.6 Schématické znázornění principu EMSA v uspořádání DNA; FoxO4; DNA:FoxO4.** Princip EMSA, kde dochází k posunu elektromigrační pozice komplexu protein:DNA oproti elektromigrační pozici volné DNA.

Pro EMSA byl použit 12% polyakrylamidový TBE gel. Elektroforéza byla provedena za nedenaturujících podmínek v prostředí TBE pufru. EMSA byla prováděna ve vertikální orientaci po dobu 20 – 30 minut při napětí 200 V a teplotě 4°C.

#### Roztoky:

##### 20x koncentrovaný TBE pufr:

121 g Tris  
61,7 g kyselina boritá  
7,44 g EDTA  
- doplněno vodou do 1 litru

##### Pufr pro přípravu vzorků:

0,6 ml 1 mol.dm<sup>-3</sup> Tris-HCl (pH 6,8)  
5,0 ml 50% glycerol  
1,0 ml 1% bromfenolová modř  
0,9 ml voda

**TBE gel pro EMSA**

4 ml	30% Akrylamid
0,5 ml	20x koncentrovaný TBE pufr
75 $\mu$ l	10% Persulfát amonný
8 $\mu$ l	TEMED
5,45 ml	voda

**30% Akrylamid:**

29,2%	Akrylamid
0,8%	Bis-akrylamid

**4.4.2 Ověření DNA vazebných vlastností FoxO4<sub>11-213</sub> fin W**

K ověření DNA vazebných vlastností proteinu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W bylo použito metody EMSA, tak jak bylo popsáno výše (kapitola 4.4.1) Pro tyto vazebné studie byl použit fragment DNA o délce 11 bp jehož sekvence odpovídá sekvenci lidské DNA, na kterou se FoxO4 proteiny obvykle specificky váží *in vivo*.

IRX1	5'-cgt tgt tta cg-3'
IRX2	5'-cgt aaa caa cg -3'

**Tab.4.6 Sekvence fragmentu DNA použitého při vazebných studiích.**

Nejprve bylo nutné připravit funkční dvouřetězcovou DNA (dsDNA) o koncentraci 50 pmol. $\mu$ l<sup>-1</sup>. K tomu bylo použito 50  $\mu$ l dDNA IRX1 o koncentraci 100 pmol.  $\mu$ l<sup>-1</sup>, dDNA IRX2 o koncentraci 100 pmol.  $\mu$ l<sup>-1</sup> a 0,5  $\mu$ l roztoku NaCl o koncentraci 5 mol. dm<sup>-3</sup>. Tímto vzniklo 100  $\mu$ l ds DNA IRX o celkové koncentraci 50 pmol.  $\mu$ l<sup>-1</sup>. Vytvořená směs byla nejprve vystavena na 20 vteřin teplotě 100°C ve vroucí vodě, poté ponechána vychladnout na teplotu 20°C a nakonec uložena při 0°C.

Dále byly připraveny vzorky obsahující dsDNA a FoxO4<sub>11-213</sub> fin W v různých molárních poměrech. Každý vzorek navíc obsahoval 7,5  $\mu$ l pufru pro přípravu vzorků. Do sedmé vzorkovací jamky na TBE gelu byla umístěna směs obsahující dsDNA a protein v molárním poměru 1:1. Pro správné určení potřebných množství roztoku proteinu musela být nejprve stanovena jeho stávající koncentrace. Toto stanovení bylo provedeno s použitím „ProtParamTool“ volně přístupného na [www.expasy.org](http://www.expasy.org) a HP8542 (Agilent Technologies, USA) kde byla zjištěna základní data pro výpočet koncentrace na základě Lambertova-Bearova zákona. Absorbance byla měřena s použitím křemenné kyvety s optickou drahou 1 cm.

vzorek č.	molární poměr FoxO4 <sub>11-213</sub> fin W: dsDNA IRX	5	1:0,5
		6	1:0,7
1	pouze dsDNA	7	<b>1:1</b>
2	pouze protein	8	1:1,1
3	1:0,1	9	1:1,4
4	1:0,25	10	1:1,7

**Tab. 4.7 Molární poměry FoxO4<sub>11-213</sub> fin W a dsDNA IRX ve vzorcích pro EMSA**

#### **Příprava vzorků:**

Nejprve byla vytvořena směs dsDNA a proteinu. Tato směs byla inkubována 5 minut při 0°C. Následně byl přidán pufr pro přípravu vzorků.

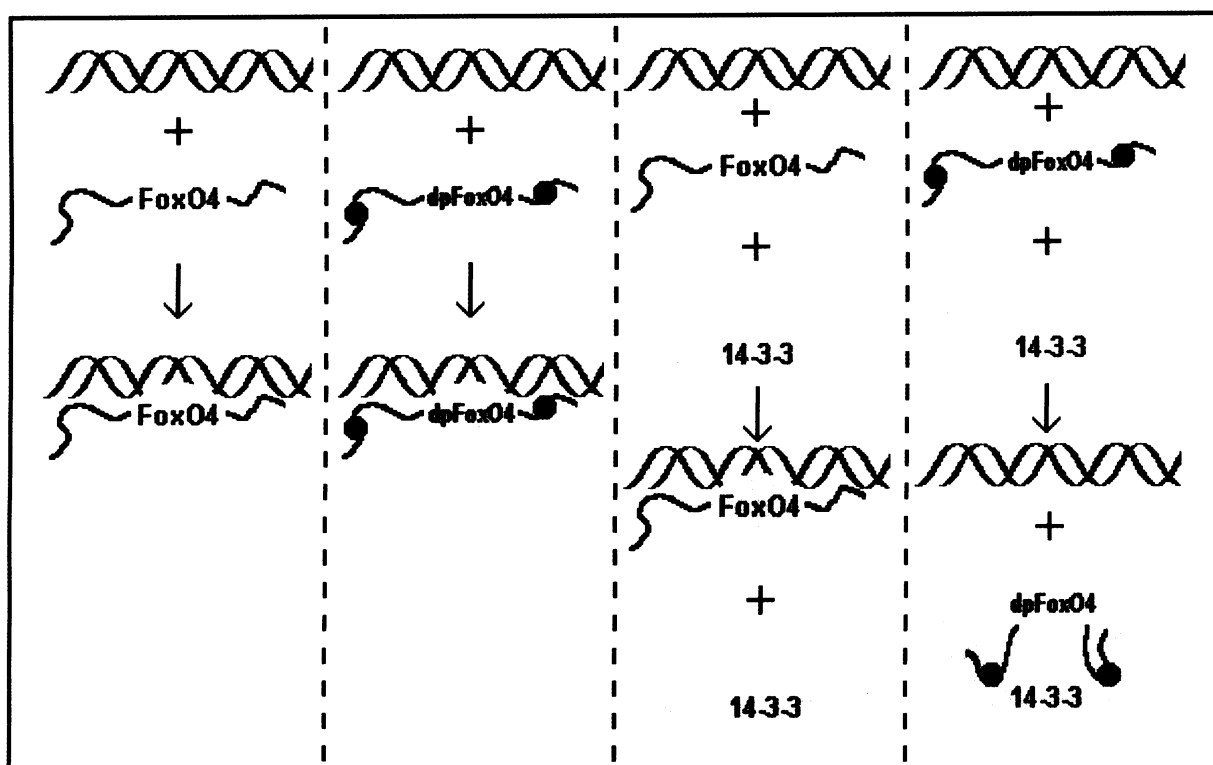
Po skončení elektroforézy byly výsledky vizualizovány metodou zvanou barvení stříbrem, jejíž podstatou je interakce koloidních částic stříbra s dvoušroubovicí DNA.

#### **Vizualizace DNA v TBE gelu ( barvení stříbrem):**

Gel byl nejprve na 15 minut ponořen do 75 ml 1% roztoku HNO<sub>3</sub>. Poté byl ponořen na 15 minut do směsi 75 ml vody s 0,5 ml 30% roztoku AgNO<sub>3</sub>. Před inkubací v dalším roztoku byl gel 3x opláchnut 75 ml vody. Následně byl inkubován 15 minut ve směsi 75 ml 0,3 M roztoku Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 6,6 μl 0,14 M roztoku Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a 37,5 μl formaldehydu. Části gelu, kde byla seskupena DNA nebo komplex DNA:protein se zbarvily dohněda. Po dosažení dostatečné intenzity zbarvení, byl gel ponořen do roztoku 10% kyseliny octové inhibující probíhající reakci.

### **4.4.3 Ověření vazebných vlastností 14-3-3ζ no W**

Protein 14-3-3ζ no W sice není DNA vazebný protein nicméně jeho funkční vlastnosti lze ověřit nepřímo metodou EMSA v uspořádání 14-3-3ζ no W; FoxO4<sub>11-213</sub> fin W; dpFoxO4<sub>11-213</sub> fin W (dvojitě fosforylovaný FoxO4<sub>11-213</sub> fin W) a DNA. Jak bylo zmíněno v úvodu, protein 14-3-3ζ no W se váže na dpFoxO4<sub>11-213</sub> fin W čímž zcela inhibuje jeho vazbu na DNA. Tato inhibice se projeví při EMSA na gelu nepřítomností komplexu DNA:FoxO4. Aby byla vyloučena jiná vysvětlení nepřítomnosti tohoto komplexu byly na gelu analyzovány ještě další kombinace těchto čtyř složek. Příprava vzorků a vizualizace výsledků byla provedena stejným způsobem jako při předchozí EMSA.



**Obr.4.7 Vazebné interakce DNA, FoxO4, dpFoxO4 a 14-3-3, jak byly simulovány při EMSA.** V jednotlivých drahách TBE gelu byly simulovány tyto rozdílné situace. Produkty jednotlivých simulací lze od sebe na gelu odlišit a tak dospět k ověření vazebných vlastností.

složka	vzorkovací jamka č.						
FoxO4 <sub>11-213</sub> fin W (250pmol)	-	+	+	+	-	-	-
dpFoxO4 <sub>11-213</sub> fin W (250 pmol)	-	-	-	-	+	+	+
ds DNA IRX (300 pmol)	+	-	+	+	-	+	+
14-3-3ζ no W (500 pmol)	-	-	-	+	-	-	+
pufr pro přípravu vzorků (7,5 μl)	+	+	+	+	+	+	+
<b>Tab. 4.8 Složení vzorků pro EMSA</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>

**Pufr pro přípravu vzorků:**

- 1x koncentrovaný TBE pufr
- 1 mg.ml<sup>-1</sup> bromfenolová modř
- 30% glycerol

## 5 Výsledky

### 5.1 Mutageneze

Hlavním smyslem této práce bylo připravit sadu proteinů pro studium konformačních změn DNA vazebné domény proteinu FoxO4 při interakci s DNA respektive se 14-3-3 proteinem. Pro tyto studie se běžně používá metod fluorescenční spektroskopie, jakou je například tryptofanová fluorescence. Tato metoda vyžaduje co nejnižší počet tryptofanů v molekule proteinu, aby se získaná data dala snadno a přesně analyzovat. Ke snížení počtu tryptofanových zbytků v úseku proteinu FoxO4 bylo použito cílené bodové mutageneze. Původně měl být pro tyto účely použit úsek 11-260, nebo 11-501. Expresní test těchto úseků ovšem ukázal, že jejich exprese vede k velmi nízkému expresnímu výtěžku, z důvodů vysoké citlivosti k proteolytické degradaci. Nakonec byl tedy navržen úsek proteinu 11-213 obsahující tryptofanová rezidua na pozicích 29, 97, 126, 173 a 174. Mutant požadovaný pro tryptofanová fluorescenční měření měl obsahovat tryptofanová rezidua pouz na pozicích 173 a 174. Ostatní tryptofanové zbytky měly být zmutovány na fenylalaninové. K tomu bylo použito opakované cílené mutageneze.

Prvním krokem cílené mutageneze byla **mutagenezní PCR** (viz kapitola 4.1.1) a štěpení původní templátové DNA enzymem Dpn I. Následovalo ověření amplifikace DNA **agarózovou elektroforézou** (viz kapitola 4.1.2). Takto připravená DNA byla **transformována do buňey kmene *E. coli* JM109** (viz kapitola 4.1.3), ze kterých byla po dostatečném napěstování kultury plazmidová DNA **izolována** (viz kapitola 4.1.4) a **osekvenována** (viz kapitola 4.1.4). Po třetí úspěšné mutaci byl navíc získanou DNA **transformován expresní kmen *E. coli* BL21(DE3)** (viz kapitola 4.1.5) a **připraven glycerolový roztok** (viz kapitola 4.1.6) této bakteriální kultury.

Protože jednotlivé mutace byly prováděny postupně, uvádím v této části výsledky pouze třetí závěrečné mutageneze. Výsledný sekvenační chromatogram souhrnně obsahuje výsledky všech tří mutací.

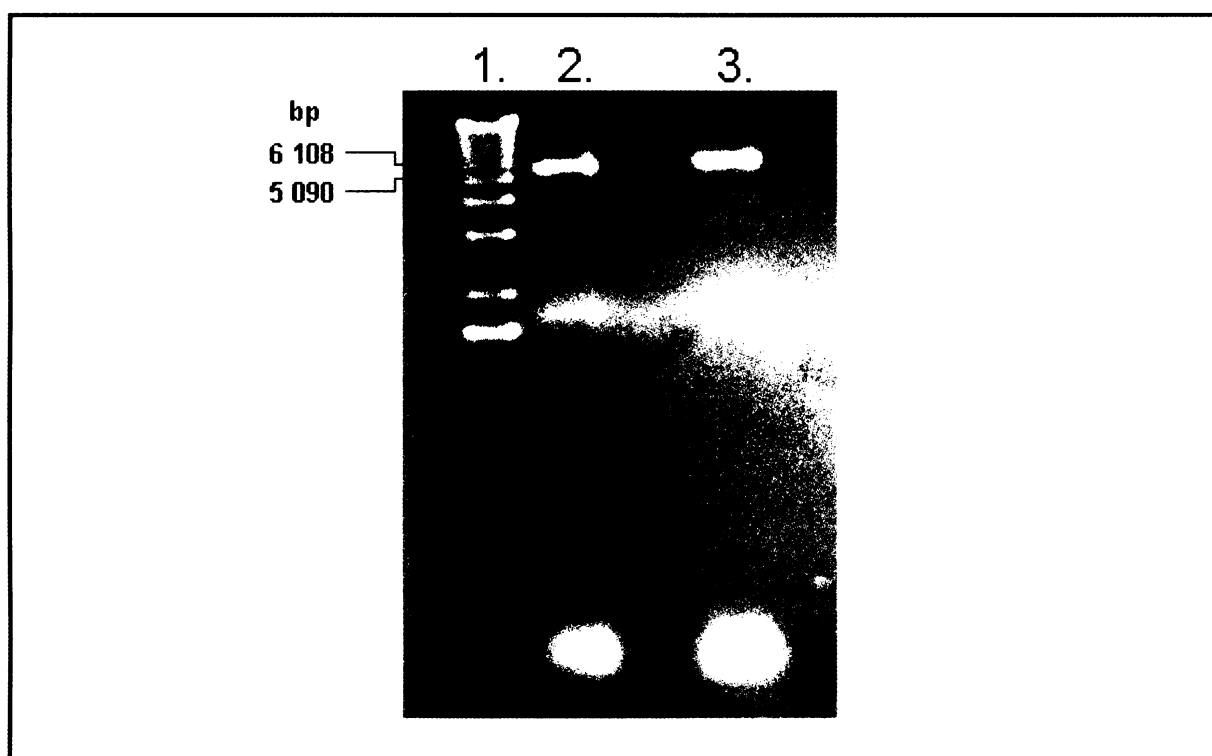


### 5.1.1 Mutagenezní PCR

Metoda PCR slouží k amplifikaci DNA v připraveném roztoku. Jejím výsledkem je tedy roztok s relativně vysokou koncentrací nukleové kyseliny. Pro ověření správného průběhu této reakce byla použita agarózová elektroforéza DNA. Výsledky tohoto ověření a tedy průběhu PCR jsou uvedeny v následující kapitole.

### 5.1.2 Agarózová elektroforéza DNA po PCR a štěpení restrikčním enzymem Dpn I

Tato metoda slouží obecně k separaci různě dlouhých segmentů DNA a lze ji využít k ověření výsledků PCR.



**Obr. 5.1 Vizualizovaný gel z agarózové elektroforézy DNA po PCR** Čísly 1., 2. a 3. jsou označeny vzorkovací dráhy jimiž procházel nanesený materiál. 1. dráha obsahovala standard molekulových hmotností a na gelu je vizualizována směs fragmentů DNA o známém počtu párů bází (bp) (viz příloha 3). 2. dráha obsahovala vzorek amplifikované DNA po PCR (vzorek A). První vizualizovaný fragment je o délce cca 5500 bp, což odpovídá velikosti plazmidu pGEX-4T-1 se zabudovaným úsekem DNA pro FoxO<sub>4</sub><sup>11-213</sup> (viz příloha 2). Druhý a třetí vizualizovaný fragment jsou nespecifické a odpovídají fragmentům methylované DNA rozštěpené enzymem Dpn I. 3. dráha obsahovala vzorek amplifikované DNA po PCR (vzorek B). Popis vizualizovaných fragmentů odpovídá dráze 2.

Elektromigrační pozice prvního vizualizovaného fragmentu odpovídá pozici vektoru pGEX-4T-1 a intenzita vizualizace odpovídá dostatečné míře amplifikaci metodou PCR. Agarózová elektroforéza DNA po PCR a štěpení restriktivním enzymem Dpn I tedy prokázala, že amplifikace DNA pomocí PCR byla úspěšná v obou vzorcích.

### 5.1.3 Transformace kompetentních buněk *E. coli* BL21(DE3)

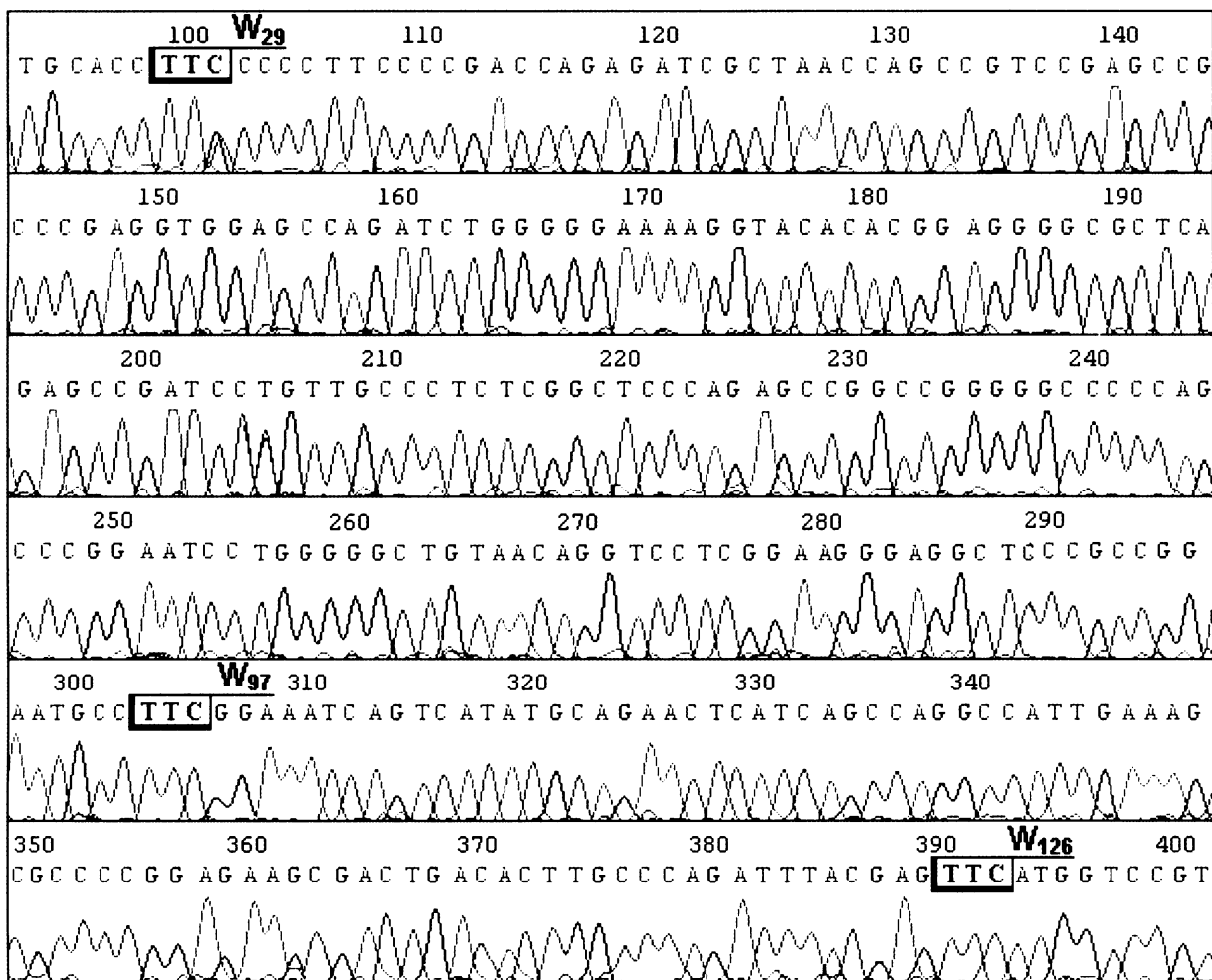
Transformace buněk *E. coli* plazmidem v podstatě znamená obohacení jejich genetické informace. Vektor pGEX-4T-1 obsahuje gen pro rezistenci na antibiotikum ampicilin. Proto buňky, které byly úspěšně transformovány tímto vektorem získávají neomezenou schopnost růstu na živném mediu obsahujícím toto antibiotikum. Prokazatelným výsledkem této transformace byla Petriho miska s asi 150 narostlými koloniemi.

### 5.1.4 Izolace plazmidové DNA

Z výše zmíněné Petriho misky byly náhodně vybrány 4 izolované kolonie bakteriální kultury (označeny A, B, C a D). Tyto kolonie byly přeneseny do kapalného LB média a odděleně inkubovány. Z vypěstovaných kultur (A, B, C, D) byly následně izolovány 4 vzorky plazmidové DNA (A, B, C, D). Tímto způsobem byly získány 4 vzorky plazmidové DNA s objemem 20  $\mu$ l.

### 5.1.5 Sekvence mutantní DNA proteinu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W

Sekvence izolované plazmidové DNA byla provedena komerčním servisem MBÚ AV ČR. Takto získaný sekvenační záznam byl porovnán se sekvenačním záznamem předchozí mutagenese respektive původním sekvenačním záznamem DNA kódujícím nemutovaný protein FoxO4<sub>11-213</sub> (příloha 1).



**Obr. 5.2 Část sekvenačního záznamu mutantní DNA kódující protein FoxO4<sub>11-213</sub> fin W se zvýrazněnými mutacemi.** Tato část záznamu se zaměřuje na oblast, ve které byly provedeny cílené bodové mutace. Zápis například W<sub>97</sub>F, značí fenylalanin, který nahradil tryptofan na pozici 97. Čísla nad značkami bází značí jejich pozici ve vektoru pGEX-4T-1.

Srovnání úplného sekvenačního záznamu DNA FoxO4<sub>11-213</sub> (viz příloha 1) se sekvenačním záznamem po třetí mutagenézi (viz příloha 5) ukazuje, že všechny mutagenézy proběhly tak jak měly a DNA nebyla poškozena jinými náhodnými nežádoucími mutacemi. Lze tedy konstatovat, že konečným výsledkem cílené bodové mutagenézy se stal vzorek plazmidové DNA kódující protein FoxO4<sub>11-213</sub> fin W (obsahuje pouze dva tryptofanové zbytky v DNA-vazebné doméně Trp-173 a Trp-174).

## 5.2 Exprese a purifikace FoxO4<sub>11-213</sub> fin W

Cílem exprese a purifikace FoxO4<sub>11-213</sub> fin W bylo připravit dostatečné množství čistého proteinu. Vzhledem k tomu, že expresní výtěžek FoxO4 není příliš vysoký a protein je značně citlivý k proteolytické degradaci, byl protein exprimován v šesti litrech bakteriální kultury. Po expresi proteinu (viz kapitola 4.2.1) následovalo několik purifikačních kroků: sonikace (viz kapitola 4.2.2.1), GST afinitní chromatografie (viz kapitola 4.2.2.2), kationtově výměnná chromatografie (viz kapitola 4.2.2.5) a gelová filtrace (viz kapitola 4.2.2.7), které byly doprovázeny úpravami roztoku proteinu jako je dialýza (viz kapitola 4.2.2.4) a zkoncentrování roztoku (viz kapitola 4.2.2.6). Fúzní partner (GST) byl odštěpen pomocí TEV proteázy (viz kapitola 4.2.2.3). V různých fázích purifikace byly navíc odebírány vzorky na SDS – PAGE (viz kapitola 4.2.2.8) pro ověření průběhu a dokumentaci procesu.

### 5.2.1 Exprese FoxO4<sub>11-213</sub> fin W

Expresi rozumíme proces, kdy buňky bakteriální kultury produkují námi požadovaný protein. Protein zůstává uvnitř buňky a proto nás z celkového objemu bakteriální kultury zajímají pouze samotné buňky. Masa buněk bakteriální kultury je od LB media oddělena centrifugací. Výsledkem této části získávání proteinu je tedy pelet bakteriální kultury jejíž buňky obsahují exprimovaný protein.

### 5.2.2 Sonikace

Po expresi proteinu následují dva kroky, které vedou k rozbití buněčné stěny bakterií, čímž se veškerý jejich obsah převede do roztoku. Významnějším z těchto kroků je rozbíjení buněčné stěny ultrazvukem – sonikace. Pro snížení intenzity potřebné pro rozbití buněčné stěny předchází sonikaci ještě inkubace v lyzovacím pufru, který obsahuje enzym lysozym. Tento enzym narušuje buněčnou stěnu bakterií. Výsledkem sonikace byl roztok, který mezi veškerými buněčnými kompartmenty a celou řadou proteinů obsahoval též protein FoxO4<sub>11-213</sub> fin W s navázanou GST afinitní kotvou.

### 5.2.3 GST afinitní chromatografie

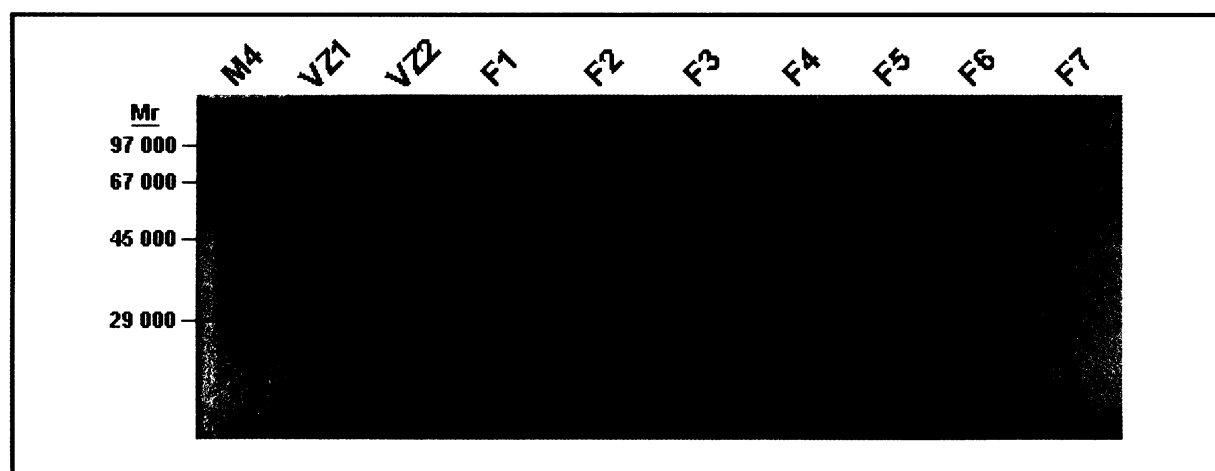
Během této metody je teoreticky možné separovat protein s navázanou GST afinitní kotvou od veškerých dalších nečistot. Využívá se při tom speciálně připravené GLU-sepharosy, na kterou se specificky váží fúzní proteiny obsahující GST. Veškeré další komponenty roztoku, které se na matrici nedokáží zachytit, jsou vymyty vhodným pufrům. Zachycené proteiny jsou z této matrice eluovány koncentrovaným roztokem glutathionu, který má ke GST větší afinitu než glutathion navázaný na matrici kolony. Výsledkem tohoto purifikačního kroku byly proteinové frakce, jejichž čistota byla analyzována metodou SDS – PAGE (obr. 5.3).

Princip SDS – PAGE je podrobně popsán v kapitole 4.2.2.8. Na tomto místě bych se jen zmínil, že vizualizovaný gel sloužil k analýze složení proteinových frakcí a k určení, které z frakcí budou použity pro další purifikační kroky.

Na gel byly nanášeny následující vzorky:

1. standard molekulových hmotností Mix 4 → **M4**
- 2-3. vzorek proteinové frakce před GST afinitní chromatografií → **VZ 1, VZ2**
4. – 10. vzorek z eluční frakce 1 – 7 → **F1 – F7**

Standardu molekulových hmotností Mix 4 bylo nanášeno 15  $\mu$ l. VZ 1 a VZ 2 tvořily 2  $\mu$ l proteinové frakce, 8  $\mu$ l vody a 5  $\mu$ l pufru pro přípravu vzorku. Vzorky frakcí byly tvořeny 15  $\mu$ l frakce a 5  $\mu$ l pufru pro přípravu vzorku.



**Obr. 5.3 12% akrylamidový gel SDS – PAGE zobrazující průběh a výsledek GST-afinitní chromatografie obarvený pomocí coomassie blue. Z tohoto gelu je patrné, že ze vzorku bylo GST-afinitní chromatografií odstraněno velké množství nečistot, což je patrné zejména z porovnání vzorků VZ1 a 2 se vzorkem F1. Dále je patrné, že nejvíce purifikovaného proteinu se elovalo do druhé a třetí frakce.**

Výsledky SDS – PAGE ukázaly, že během GST-afinitní chromatografie se protein FoxO4<sub>11-213</sub> fin W eluoval zejména ve 2. a 3. frakci. Dále je z gelu patrné, že touto purifikační metodou došlo k odstranění velkého množství nečistot. Přesto vzorek stále obsahoval řadu nečistot a degradačních produktů. (Relativní molekulová hmotnost FoxO4<sub>11-213</sub> fin W s navázanou glutathion-S-transferázou je 47 645). Pro další postup byly použity frakce 2 a 3.

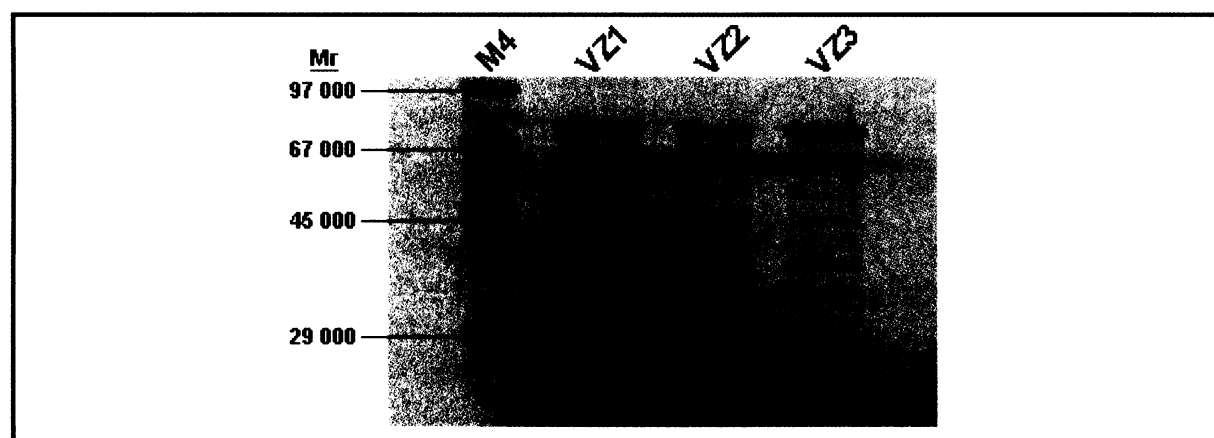
## 5.2.4 Specifické štěpení TEV proteázou

Díky GST navázané na proteinu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W bylo možné protein separovat od velkého množství nečistot. V další postupu však již GST není žádoucí a proto je ji nutné odštěpit. To se provádí enzymem TEV proteázou, která specificky štěpí místo mezi GST a FoxO4. Průběh a výsledek tohoto štěpení reprezentuje gel z SDS – PAGE (obr. 5.4).

Na gel byly nanášeny následující vzorky:

1. standard molekulových hmotností Mix 4 → **M4**
2. vzorek před štěpením TEV proteázou → **VZ 1**
3. vzorek po 40 minutách štěpení TEV proteázou → **VZ 2**
4. vzorek po 80 minutách štěpení TEV proteázou → **VZ 3**

Standardu molekulových hmotností Mix 4 bylo nanášeno 15  $\mu$ l. VZ 1, VZ 2 a VZ 3 tvořilo 15  $\mu$ l proteinové frakce a 5  $\mu$ l pufru pro přípravu vzorku.



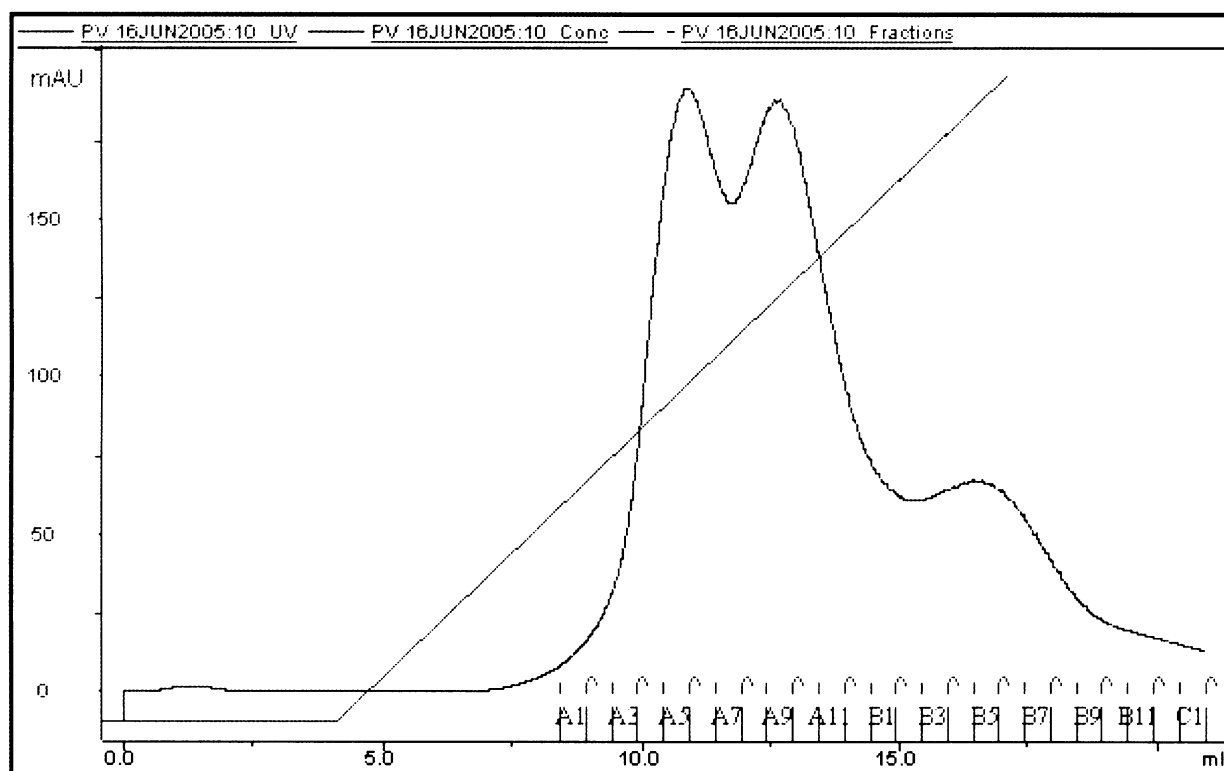
**Obr. 5.4** 12% akrylamidový gel SDS – PAGE zobrazující průběh a výsledek specifického štěpení TEV proteázou obarvený pomocí coomassie blue. Z tohoto gelu je patrné, že ke kvantitativnímu odštěpení GST došlo již před odebráním první vzorku, tedy během prvních 40 minut inkubace vzorku s TEV proteázou. Dále je patrné, že rozštěpením proteinu s GST došlo ke snížení relativní molekulové hmotnosti zhruba na polovinu.

Na gelu lze pozorovat, že protein FoxO4<sub>11-213</sub> fin W s navázanou glutathion-S-transferázou byl rozštěpen TEV proteázou na 2 fragmenty o velmi podobné velikosti. Na základě znalosti relativních molekulových hmotností FoxO4<sub>11-213</sub> fin W (22 164) a GST (25 481) lze říci, že komplex byl rozštěpen správně. Z porovnání vzorku 2 a 3 lze soudit, že ke kvantitativnímu rozštěpení došlo již v průběhu prvních 40 minut štěpení.

## 5.2.5 Kationtově výměnná chromatografie

Tato metoda využívá závislosti náboje proteinu na hodnotě pH prostředí. Při kationtově výměnné chromatografii proteinů je pH hnacího pufru nastaveno nižší než je pI purifikovaného proteinu. Teoreticky by se touto metodou měl vzorek FoxO4 proteinu očistit od všech proteinů, které mají pI nižší nebo rovno pH hnacího pufru (tyto proteiny mají v tomto prostředí záporný náboj a na matrici se nezachytí). Zachycené proteiny jsou poté eluovány z matrice puftrem se zvyšující se iontovou silou.

Znázorněním výsledků kationtově výměnné chromatografie je chromatogram znázorňující průběh eluce proteinových frakcí (obr. 5.5) a gel z následné SDS – PAGE (obr. 5.6).

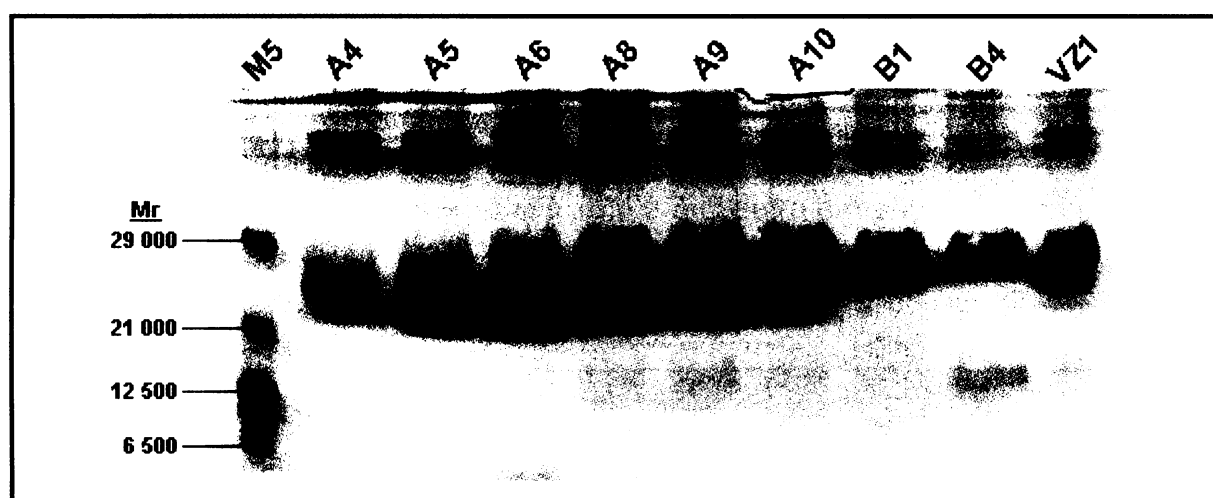


**Obr. 5.5 Chromatogram kationtově výměnné chromatografie.** Podle modré křivky, která znázorňuje závislost absorbance na koncentraci proteinu ve vzorku je patrné, že největší množství proteinu se elovalo do frakcí A3 a B7.

Na gel byly nanášeny následující vzorky:

1. standard molekulových hmotností Mix 5 → **M5**
2. – 9. vybrané proteinové frakce → **A4, A5, A6, A8, A9, A10, B1 a B4**
10. vzorek proteinové frakce před kationtově výměnnou chromatografií → **VZ 1**

Standardu molekulových hmotností Mix 5 bylo nanášeno 15  $\mu$ l. Vzorky proteinových frakcí a vzorek VZ 1 byly tvořeny 10  $\mu$ l frakce a 5  $\mu$ l pufru pro přípravu vzorků.



**Obr. 5.6 12% akrylamidový gel SDS – PAGE zobrazující průběh a výsledek kationtově výměnné chromatografie obarvený pomocí Coomassie blue.** Na tomto gelu je patrné, že proteinové frakce jsou již relativně čisté. Obsahují minimální množství nečistot. V některých frakcích (A4 až A8) je ovšem možné pozorovat degradační produkty FoxO4<sub>11-213</sub> fin W, které se mají nižší molekulovou hmotnost a na gelu proto doputovaly dále.

Z chromatogramu je patrné, že na matici byly zachyceny i jiné proteiny než FoxO4<sub>11-213</sub> fin W. Tyto proteiny se ovšem z matrice eluovaly při v intervalu gradientu iontové síly elučního pufru, kterou na obrázku znázorňuje hnědá křivka, čímž se dostaly do odlišných frakcí než protein FoxO4<sub>11-213</sub> fin W. Ten se eluoval v poměrně úzkém intervalu gradientu iontové síly elučního pufru a byl zachycen zejména do frakcí A4 až B5.

Z gelu SDS – PAGE je patrné, že frakce A4 až A8 obsahují protein FoxO4<sub>11-213</sub> fin W, který ovšem během kationtově výměnné chromatografie částečně degradoval (snížila se jeho molekulová hmotnost). Další frakce obsahují zatím neporušený protein FoxO4<sub>11-213</sub> fin W. Z toho frakce A9 až B4 v relativně dostatečném množství a stupněm čistoty.



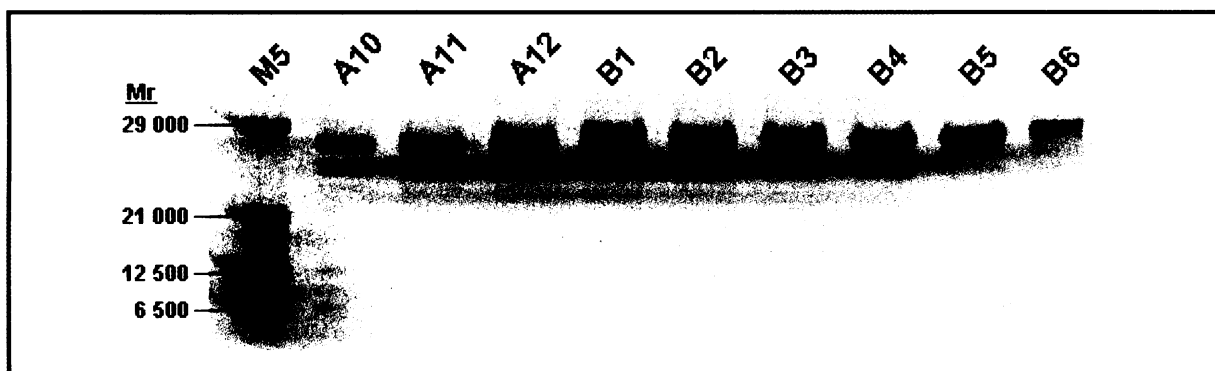
## 5.2.6 Gelová filtrace

Gelová filtrace je chromatografie, která rozděluje proteiny na úplně jiném fyzikálně-chemickém principu než kationtově výměnná chromatografie. Z toho vyplývá, že touto metodou je možné proteiny separovat na základě odlišných kritérií, což by mělo vést k dalšímu zvýšení čistoty vzorku FoxO4 proteinu. Tímto kritériem je molekulová hmotnost. Znázorněním výsledků gelové chromatografie je opět chromatogram znázorňující průběh eluce proteinových frakcí (obr. 5.7 a 5.8) a gel z následné SDS – PAGE (obr. 5.9).

Na gel byly nanášeny následující vzorky:

1. standard molekulových hmotností Mix 5 → **M5**
2. – 10. vybrané proteinové frakce → **A10 až B6**

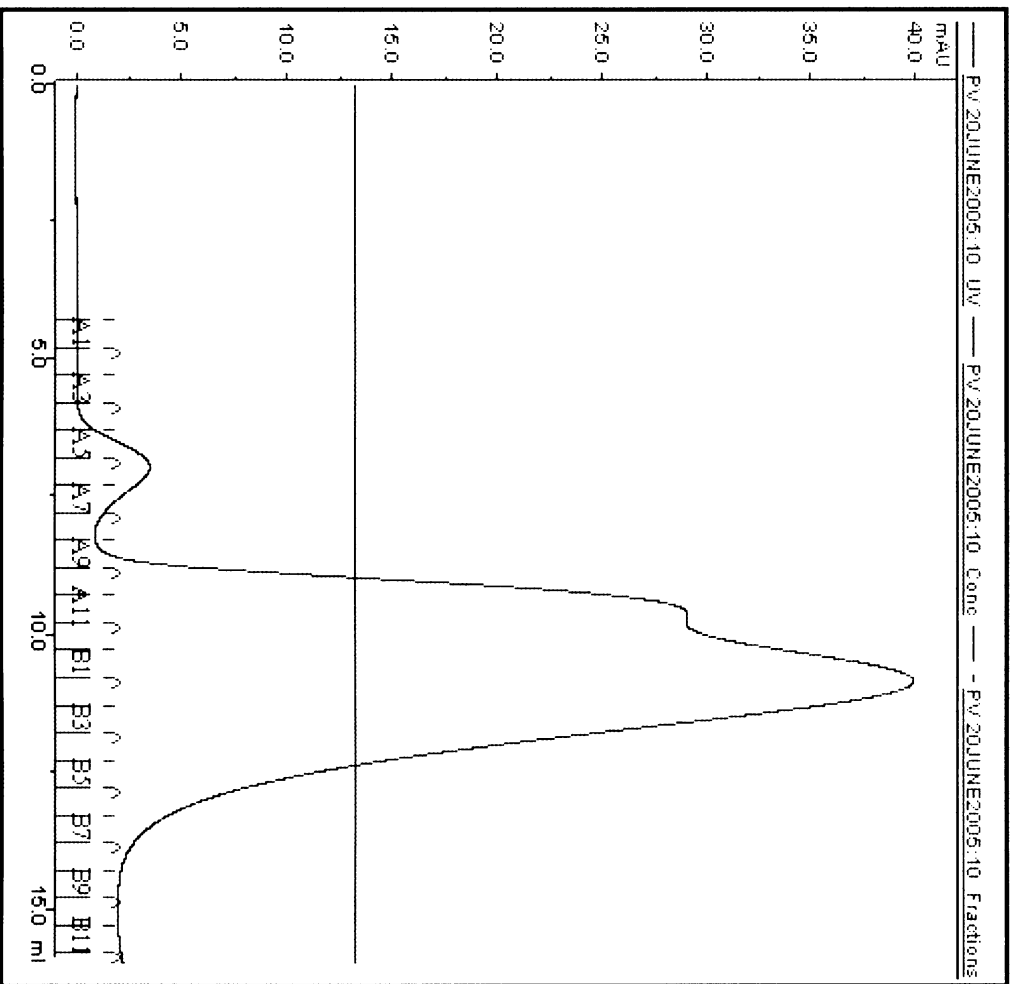
Standardu molekulových hmotností Mix 5 bylo nanášeno 15  $\mu$ l. Vzorky proteinových frakcí byly tvořeny 10  $\mu$ l frakce a 5  $\mu$ l pufru pro přípravu vzorků.



**Obr. 5.9 12% akrylamidový gel SDS – PAGE zobrazující průběh a výsledek gelové filtrace obarvený pomocí coomassie blue.** Tento gel představuje vizualizaci čistoty a složení výsledného roztoku proteinu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W. Je zřejmé, že ve všech nanesených vzorcích se nachází již dostatečně čistý protein.

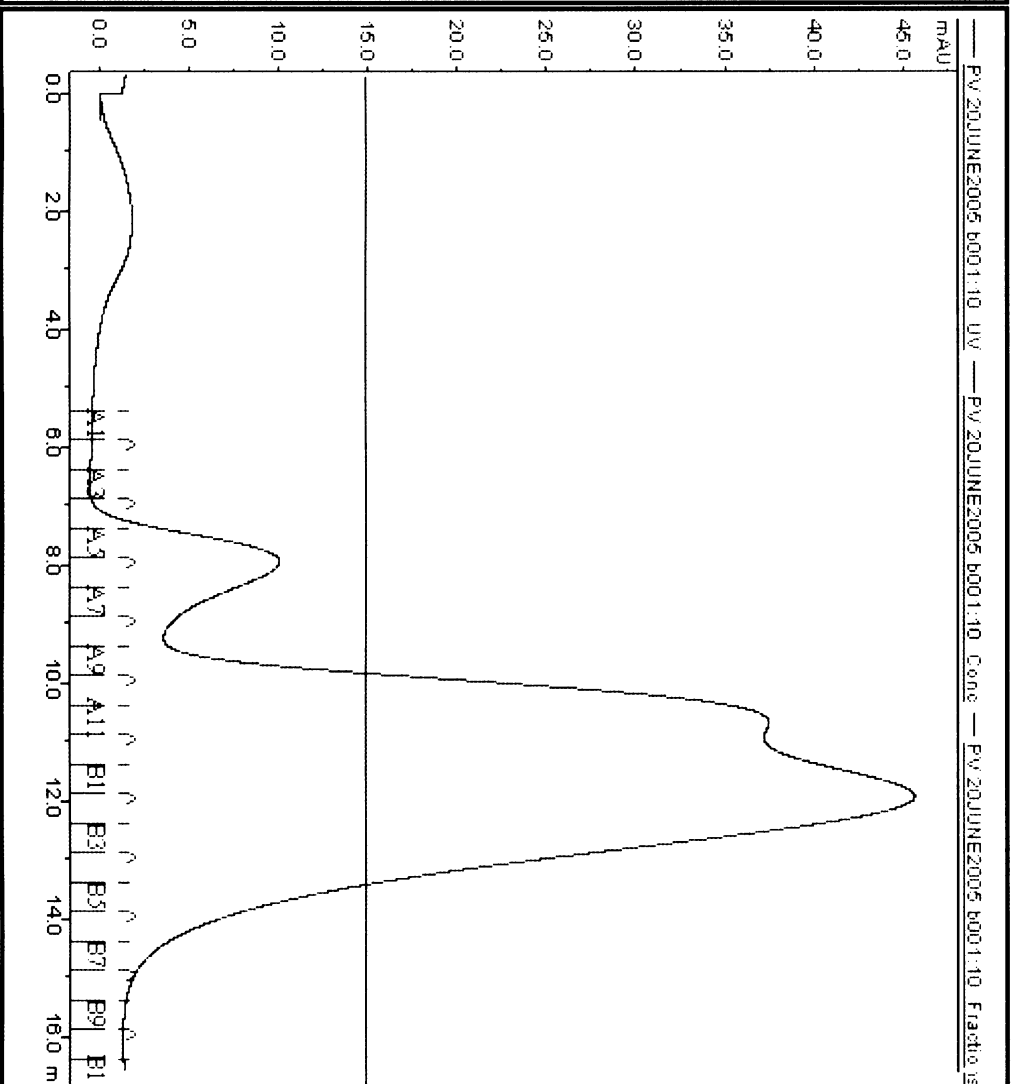
Výsledky SDS – PAGE 4 ukázaly, že protein FoxO4<sub>11-213</sub> fin W ve frakcích A10 až B1 je již relativně čistý (i když obsahuje malé množství degradačního produktu). Z gelu lze zároveň soudit, že se podařilo vypurifikovat dostatečné množství pro další pokusy s tímto proteinem.

Celkovým výsledkem exprese a purifikace proteinu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W bylo 8,4 ml roztoku proteinu o koncentraci  $14,5 \cdot 10^{-6}$  mol.dm<sup>-3</sup> respektive 2,69 mg proteinu (koncentrace byla stanovena spektrofotometricky - viz kapitola 4.2.2.3).



**Obr. 5.7 Chromatogram gelové filtrace – běh 1.**

Z těchto chromatogramů je patrné, že protein se eluoval do frakcí A9 až B7. Frakce A5 až A8 zachytily patrně nečistoty, které se eluovaly dřív než protein FoxO4<sup>1-213</sup> fin W.



**Obr. 5.8 Chromatogram gelové filtrace – běh 2.**

## 5.3 Exprese a purifikace proteinu 14-3-3 $\zeta$ no W

Cílem exprese a purifikace 14-3-3 $\zeta$  no W bylo připravit dostatečné množství čistého proteinu. Protein 14-3-3 $\zeta$  no W není tak citlivý k proteolytické degradaci jako protein FoxO4<sub>11-213</sub> fin W, nicméně jsem expresi prováděl rovněž ze šesti litrů bakteriální kultury a výtěžek navíc poskytl dalším experimentátorům. Po expresi proteinu (viz kapitola 4.3.1) následovalo několik purifikačních kroků: sonikace (viz kapitola 4.2.2.1), niklová chelatační chromatografie (viz kapitola 4.3.2.1) a aniontově výměnná chromatografie (viz kapitola 4.3.2.3), které byly doprovázeny úpravami roztoku proteinu jako je dialýza (viz kapitola 4.3.2.4) a také úpravou exprimovaného proteinu restrikním štěpením thrombinem (viz kapitola 4.3.2.2). V různých fázích purifikace byly navíc odebrány vzorky na SDS – PAGE (viz kapitola 4.2.2.8) pro ověření průběhu a dokumentaci procesu.

### 5.3.1 Exprese proteinu 14-3-3 $\zeta$ no W

Viz kapitola 5.2.1.

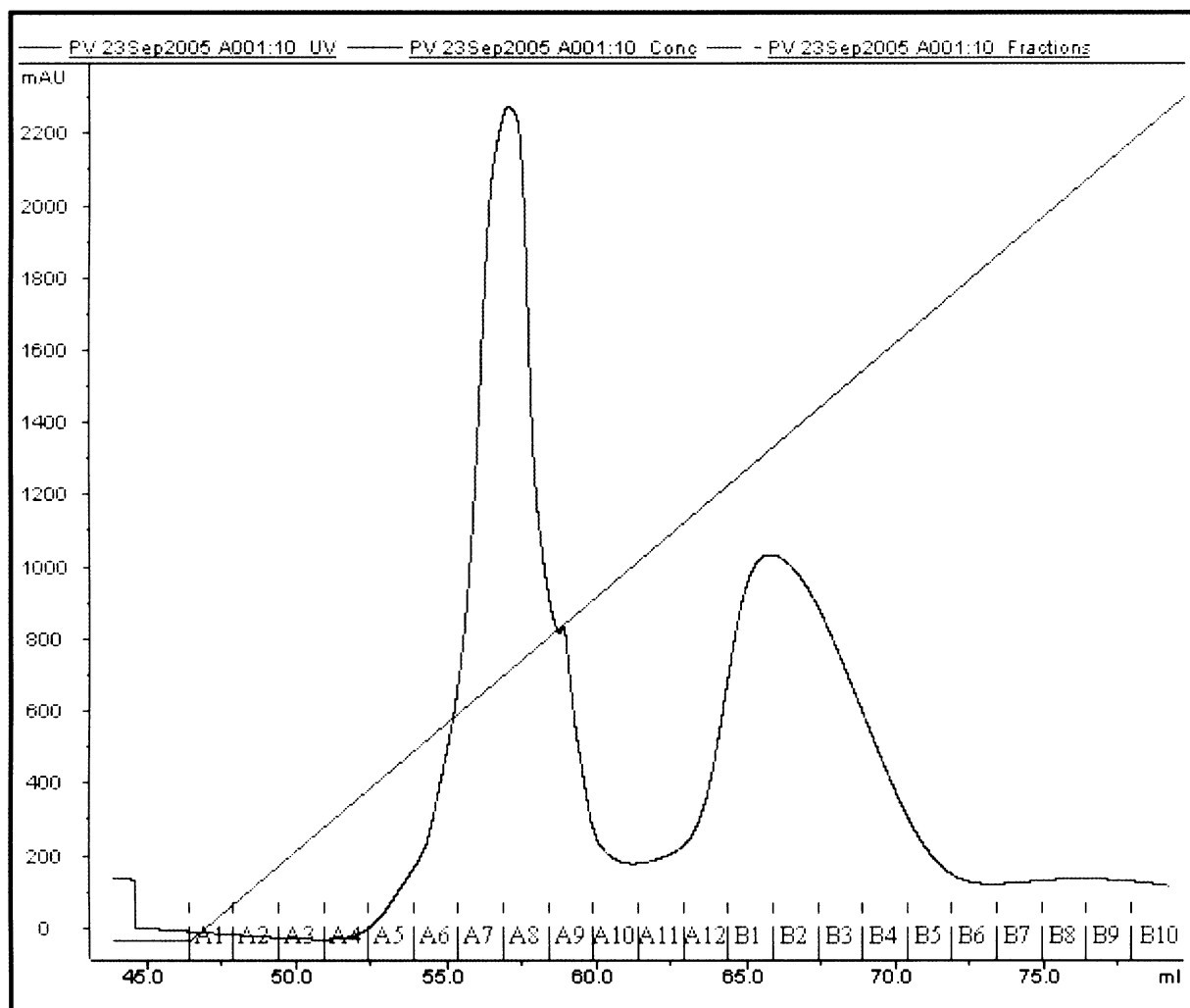
### 5.3.2 Sonikace

Viz kapitola 5.2.2.

### 5.3.3 Niklová chelatační chromatografie

Tato purifikační metoda separuje proteiny, které mají na C konci sekvenci šesti histidinů. Tyto proteiny specificky interagují s nikelnatými kationty navázanými na sepharosové matrici. Nenavázané nečistoty a nespecificky navázané proteiny jsou vymývány pufrům se zvyšující se koncentrací imidazolu, který se na nikelnaté ionty váže silněji než proteiny se sekvencí His-tag. Výsledkem takovéto chromatografie jsou frakce, které jsou dále analyzovány.

Výsledky analýzy niklové chelatační chromatografie jsou ve formě chromatogramu znázorňujícího průběh eluce proteinových frakcí (obr. 5.10) a gelu z následné SDS – PAGE (obr. 5.11).



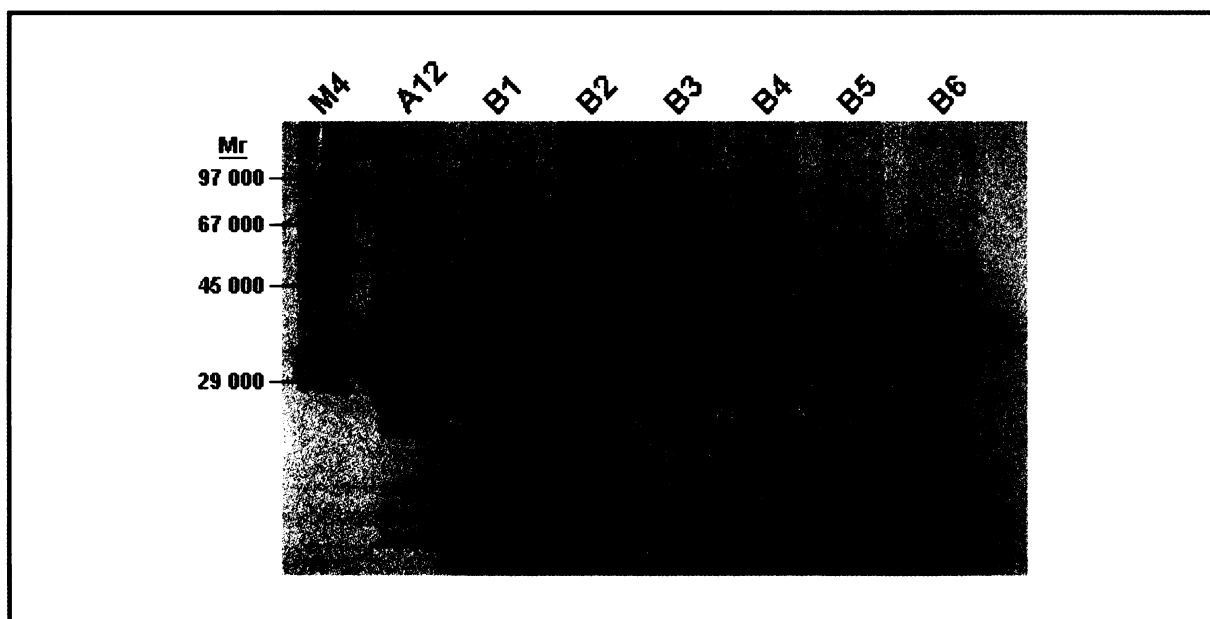
**Obr. 5.10 Chromatogram niklové chromatografie.** První pík tohoto grafu odpovídá eluci nečistot. Teprve druhý pík představuje eluci purifikovaného proteinu 14-3-3 $\zeta$  no W.

Za předpokladu, že nenavázané nečistoty a nespecificky navázané proteiny se při stoupající koncentraci imidazolu v pufru (hnědá křivka) eluují jako první, můžeme soudit, že protein 14-3-3 $\zeta$  no W se eluoval do frakcí A12 až B6. K ověření této skutečnosti a efektivity tohoto purifikačního kroku byla provedena SDS-PAGE.

Na gel byly nanášeny následující vzorky:

1. standard molekulových hmotností Mix 4 → **M4**
2. – 8. vybrané proteinové frakce → **A12 a B1 až 6**

Standardu molekulových hmotností Mix 4 bylo nanášeno 15  $\mu$ l. Vzorky frakcí byly tvořeny 15  $\mu$ l frakce a 5  $\mu$ l pufru pro přípravu vzorku.



**Obr. 5.11** 12% akrylamidový gel SDS – PAGE zobrazující průběh a výsledek niklové chelatační chromatografie obarvený pomocí coomassie blue. Na gelu vidíme vizualizované vzorky frakcí po niklové chelatační chromatografii. Z této vizualizace je patrné, že vzorky jsou již po tomto purifikačním kroku relativně čisté a dostatečně koncentrované.

Analýza výsledků niklové chelatační chromatografie metodou SDS–PAGE ukázala, že tento purifikační krok byl poměrně účinný a frakce A12 až B1 obsahují relativně čistý protein v dostatečné koncentraci.

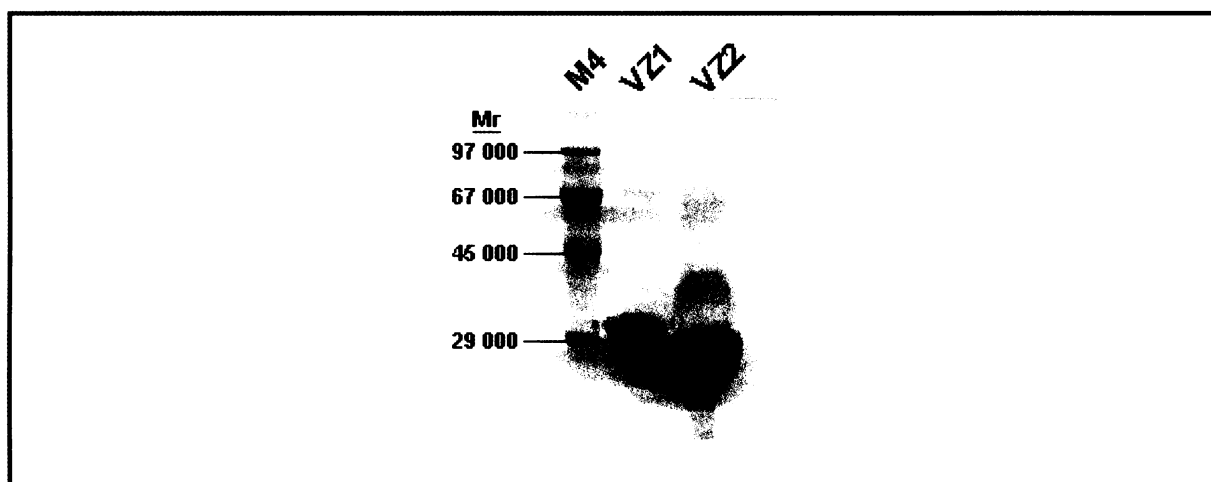
### 5.3.4 Thrombinové štěpení

Přestože sekvence His-tag je v porovnání s velikostí proteinu zanedbatelná i v tomto případě je lepší afinitní kotvu odštěpit. Provádí se to proteázou thrombinem, která specificky štěpí vazbu v místě napojení sekvence His-tag. Znárodněním průběhu a výsledku tohoto štěpení je opět analýza vzorků metodou SDS – PAGE.

Na gel byly nanášeny následující vzorky:

1. standard molekulových hmotností Mix 4 → **M4**
2. vzorek před štěpením trombinem → **VZ 1**
3. vzorek po štěpení trombinem → **VZ 2**

Standardu molekulových hmotností Mix 4 bylo nanášeno 15  $\mu$ l. VZ 1, VZ 2 a VZ 3 tvořilo 15  $\mu$ l proteinové frakce a 5  $\mu$ l pufru pro přípravu vzorku.



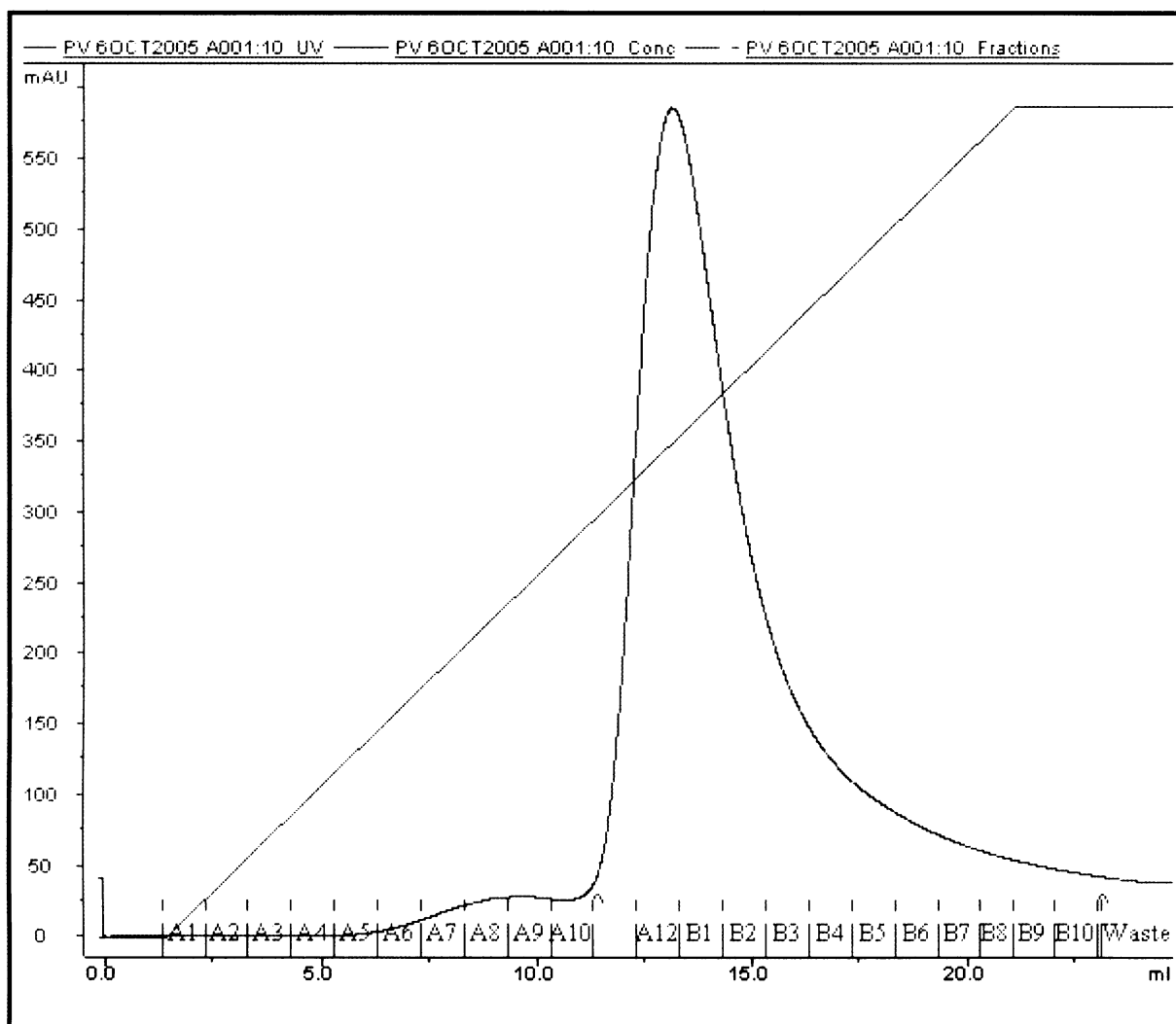
**Obr. 5.11 12% akrylamidový gel SDS – PAGE zobrazující průběh a výsledek štěpení thrombinem obarvený pomocí coomassie blue.** Vzorek VZ2 představující protein po odštěpení His-Tag afinitní kotvy doputoval na gelu dále než vzorek odebraný před tímto štěpením. To odpovídá snížení molekulové hmotnosti proteinu a tedy odštěpení sekvence His-Tag.

Na gelu lze pozorovat, že protein po štěpení thrombinem zmenšil jen nepatrně svoji relativní molekulovou hmotnost. To ukazuje na skutečnost, že thrombinovým štěpením byla odštěpena opravdu pouze histidinová afinitní kotva tvořená řetězcem šesti histidinů.

### 5.3.5 Aniontově výměnná chromatografie

Tato metoda využívá závislosti náboje proteinu na hodnotě pH prostředí. Při aniontově výměnné chromatografii proteinů je pH hnacího pufru nastaveno vyšší než je pI purifikovaného proteinu. Teoreticky by se touto metodou měl roztok očistit od všech proteinů, které mají pI vyšší než je pH hnacího pufru, protože ty mají v tomto prostředí kladný náboj a na matici se nezachytí. Zachycené proteiny jsou poté eluovány z matrice pufrům se zvyšující se iontovou silou .

Znázorněním výsledků aniontově výměnné chromatografie je chromatogram znázorňující průběh eluce proteinových frakcí (obr. 5.2) a gel z následné SDS – PAGE (obr. 5.13).

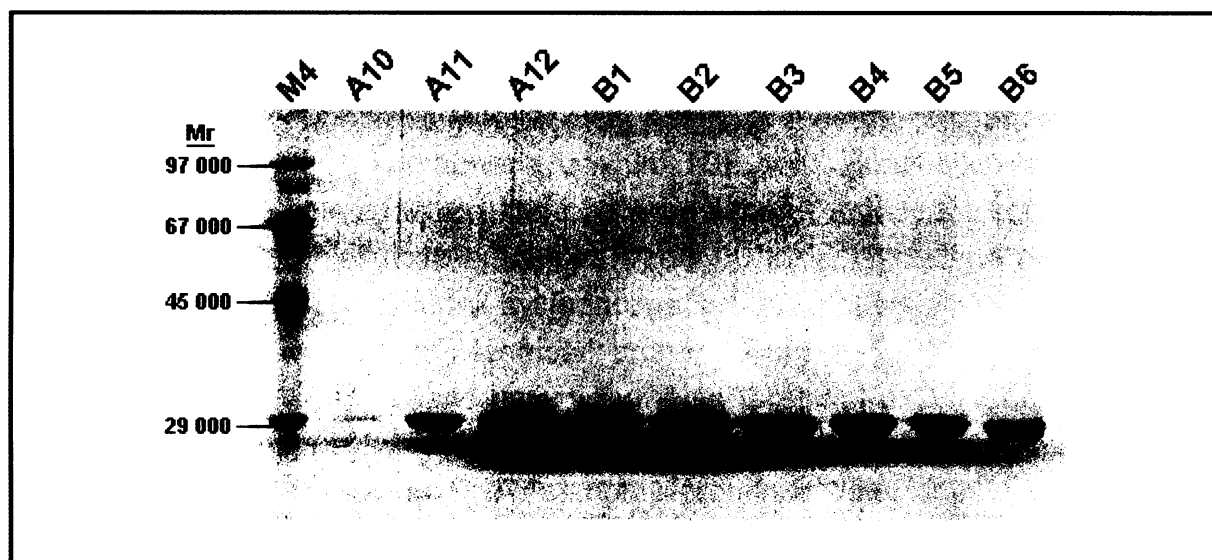


**Obr. 5.12 Chromatogram aniontové výměnné chromatografie.** Z chromatogramu aniontové výměnné chromatografie je patrné, že před elucí gradientem iontové síly (hnědá křivka) již v roztoku bylo minimální množství nečistot. Další nečistoty se navíc eluovaly dříve než protein 14-3-3ζ no W do frakcí A6 až A10. Největší množství proteinu 14-3-3ζ no W byla eluována do frakcí A10 až B6.

Na gel byly nanášeny následující vzorky:

1. standard molekulových hmotností Mix 4 → **M4**
2. – 10. vybrané proteinové frakce → **A10 až A12 a B1 a B6**

Standardu molekulových hmotností Mix 5 bylo nanášeno 15 µl. Vzorky proteinových frakcí a vzorek VZ 1 byly tvořeny 10 µl frakce a 5 µl pufru pro přípravu vzorků.



**Obr. 5.13** 12% akrylamidový gel SDS – PAGE zobrazující průběh a výsledek aniontově výměnné chromatografie obarvený pomocí coomassie blue. Z obrázky je patrné, že ve vzorcích se nachází téměř výlučně purifikovaný protein.

Z tohoto gelu je patrné, že již po aniontově výměnné chromatografii byl získán dostatečně čistý protein 14-3-3 $\zeta$  no W. Navíc ve velkém množství frakcí se protein nacházel v dostatečně vysoké koncentraci a proto mohly být spojeny frakce A11 až B6 bez výrazného snížení koncentrace roztoku.

Celkovým výsledkem exprese a purifikace proteinu 14-3-3 $\zeta$  no W bylo 18,5 ml roztoku o koncentraci  $7,6 \cdot 10^{-6}$  mol.dm<sup>-3</sup> respektive 38,7 mg dostatečně čistého proteinu.

## 5.4 Ověření vazebných vlastností purifikovaných proteinů

Cílem vazebných studií proteinů FoxO<sub>4</sub><sup>11-213</sup> fin W a 14-3-3 $\zeta$  no W bylo ověřit jestli si rekombinantní proteiny připravené expresí v bakteriích E.coli uchovaly své vazebné schopnosti a chovají se v tomto směru jako proteiny exprimované v eukaryotních buňkách. Šlo tedy o to ověřit, zda protein FoxO<sub>4</sub><sup>11-213</sup> fin W specificky interaguje s DNA a protein 14-3-3 $\zeta$  no W specificky interaguje s fosforylovaným proteinem FoxO<sub>4</sub><sup>11-213</sup> fin W.

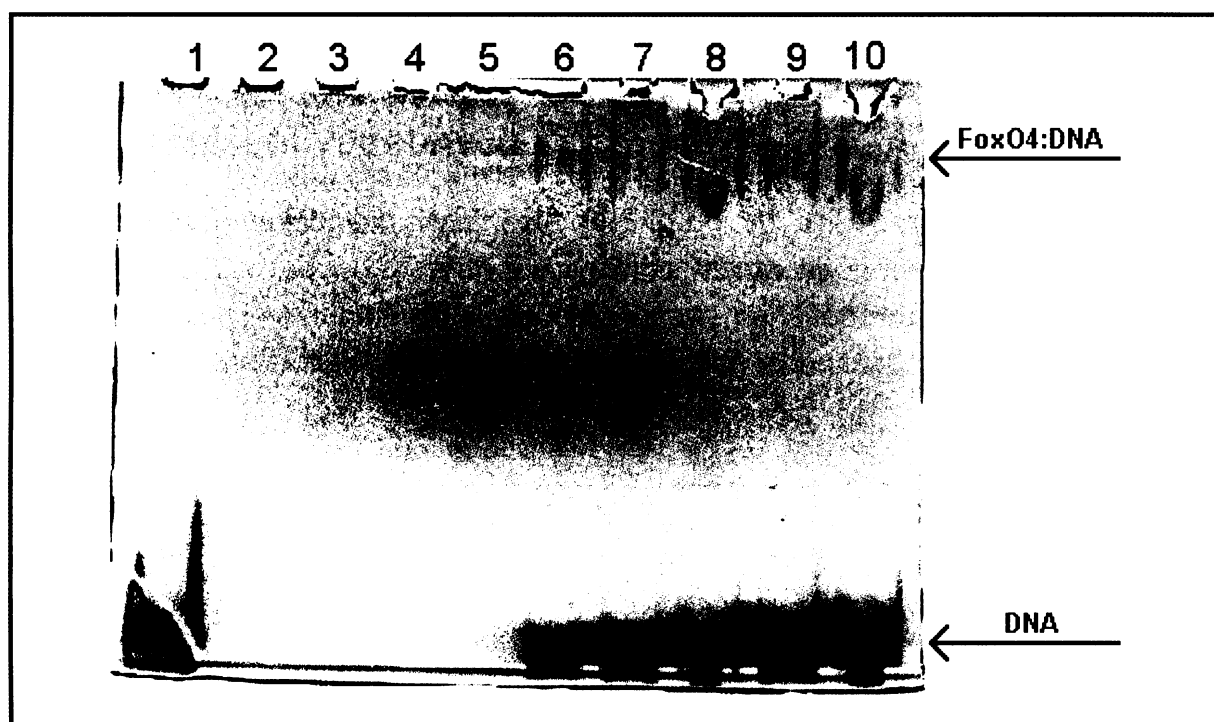
Výsledkem orientačního ověření vazebných vlastností proteinů FoxO<sub>4</sub><sup>11-213</sup> fin W a 14-3-3 $\zeta$  no W byly dvě vazebné eseje, jejichž vzorky byly připraveny tak, aby prokázaly vazebné vlastnosti proteinů. Tyto eseje byly provedeny pomocí nativní elektroforézy (metodou EMSA).



### 5.4.1 Ověření DNA vazebných vlastností FoxO4<sub>11-213</sub> fin W

EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) je metoda, jejíž princip je založen na migraci studovaných komponent nativním TBE gelu. Hnací silou této migrace je elektromagnetické pole a faktory, které od sebe separují studované komponenty jsou elektrický náboj a molekulová hmotnost. Vzorky u takto prováděné eseje musí být vhodně namíchány, aby výsledek byl jednoznačně interpretovatelný.

Při ověření vazebných vlastností proteinu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W jsem vycházel z předpokladu, že v neporušené nativní formě se protein FoxO4 specificky váže na molekuly DNA. Aby byly výsledky jednoznačně interpretovatelné, musely vzorky obsahovat jednak samotnou DNA, samotný protein a dále směs proteinu a DNA v různých molárních poměrech.



**Obr. 5.14** 12% nativní TBE gel vazebné eseje k ověření DNA vazebných vlastností proteinu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W obarvený metodou barvení stříbrem. Na tomto gelu jsou v horní části vizualizována místa, která obsahují komplex FoxO4:DNA. Ve spodní části došlo k obarvení volné DNA. V drahách 2 až 5 nedošlo k dostatečnému obarvení vzorků.

Barvením stříbrem došlo na gelu k vizualizaci míst s dostatečnou koncentrací DNA nebo komplexu protein:DNA.

Do 1. dráhy byla nanášena pouze DNA. Tím byla určena elektromigrační poloha samotné DNA nutná pro srovnání se vzorky komplexů.

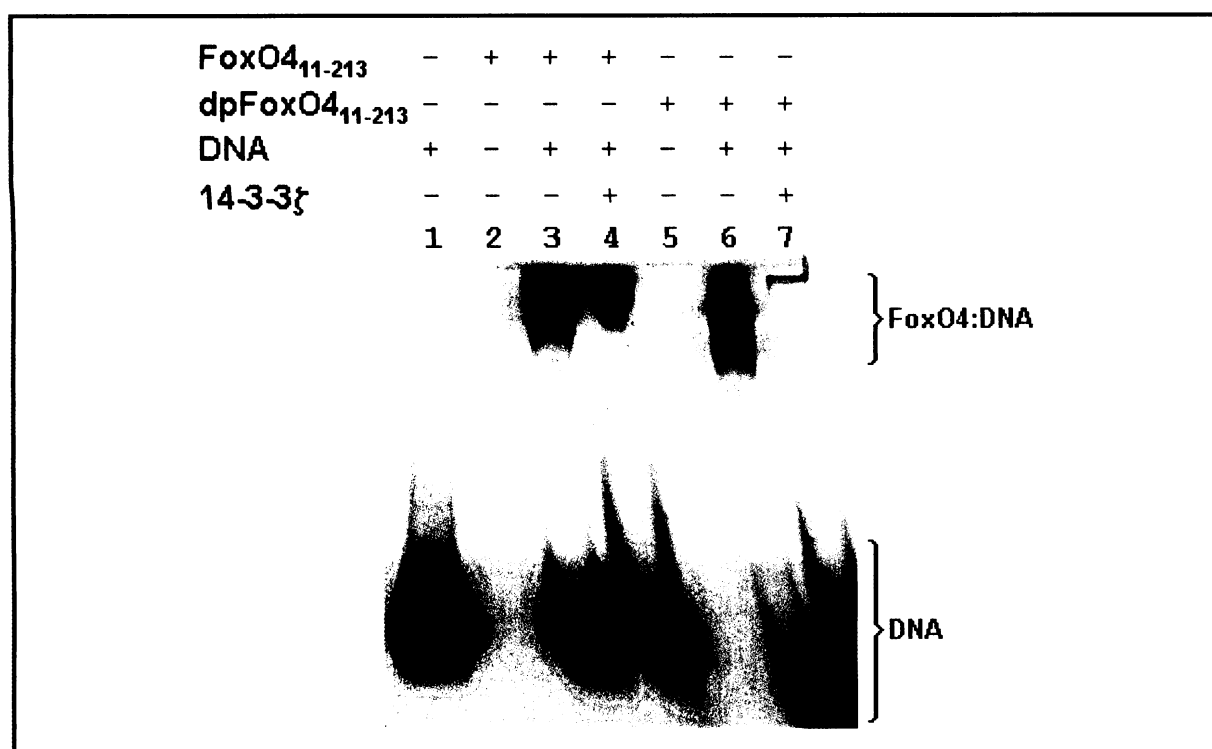
Ve 2. až 5. dráze nedošlo k vizualizaci žádných vzorků. Vzorek ve 2. vzorkovací jamce obsahoval pouze studovaný protein, tudíž nemohlo k vizualizaci dojít. Vzorky ve 3. až 6. jamce patrně obsahovaly DNA v koncentraci pod hranici detekce touto metodou a tak nemohl být vizualizován ani případný komplex, ani nenavázaná DNA.

V 6. až 10. dráze lze pozorovat vizualizaci komplexu protein:DNA a zároveň vizualizaci nenavázané DNA.

Na základě výše zmíněných dílčích tvrzení lze konstatovat, že při inkubaci vzorků došlo k vytvoření komplexu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W:DNA. Tím bylo dokázáno, že protein FoxO4<sub>11-213</sub> fin W exprimovaný prokaryotním exprimačním systémem a purifikovaný popsány metodami se váže na DNA a lze ho tedy použít k pokusům, které sledují změnu konformace DNA vazebné domény tohoto transkripčního faktoru.

#### 5.4.2 Ověření vazebných vlastností 14-3-3ζ no W

Ověření vazebných vlastností 14-3-3 no W bylo provedeno též metodou EMSA. Bylo provedeno nepřímo s využitím vlastnosti proteinu 14-3-3 inhibovat interakci fosforylovaného FoxO4 s DNA. Vzorky nanášené na TBE gel obsahovaly různé kombinace složek, aby výsledky bylo možné jednoznačně interpretovat.



**Obr. 5.15 12% nativní TBE gel vazebné eseje k ověření vazebných vlastností proteinu 14-3-3 $\zeta$  no W obarvený metodou barvení stříbrem.** *Na tento gel byly nanášeny různé kombinace vzorků uvedených v levé horní části obrázku. Vzorky, které byly ve vzorkovací dráze přítomny jsou označeny znaménkem +. Ostatní jsou označeny znaménkem -. Obarvená místa na gelu odpovídají místům, která obsahují DNA buď v komplexu, nebo volnou.*

**Popis:**

1. dráha obsahovala pouze DNA. Vizualizací bylo ověřeno správné fungování metody a určena elektromigrační poloha DNA na gelu.
2. dráha obsahovala pouze protein FoxO4<sub>11-213</sub> fin W. Ten nepodléhá vizualizaci barvení stříbrem.
3. dráha obsahovala nenafosforylovaný protein FoxO4<sub>11-213</sub> fin W a DNA. Vizualizace komplexu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W:DNA ověřila, že za daných podmínek dochází k jeho vzniku.
4. dráha obsahovala nenafosforylovaný FoxO4<sub>11-213</sub> fin W, DNA a protein 14-3-3 $\zeta$  no W. Zde bylo ověřeno, že nenafosforylovaný FoxO4<sub>11-213</sub> fin W neinteraguje se 14-3-3 $\zeta$  no W a stále dochází ke vzniku komplexu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W:DNA.
5. dráha obsahovala pouze fosforylovaný FoxO4<sub>11-213</sub> fin W, který nepodléhá vizualizaci.
6. dráha obsahovala DNA a fosforylovaný FoxO4<sub>11-213</sub> fin W, čímž bylo ověřeno, že i v tomto případě vzniká komplex protein:DNA.
7. dráha obsahovala DNA, 14-3-3 $\zeta$  no W a fosforylovaný FoxO4<sub>11-213</sub> fin W. V tomto případě se ukázalo, že k vytvoření komplexu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W s DNA nedochází, což znamená, že jeho vazba na DNA je inhibována proteinem vazbou na proteiín 14-3-3 $\zeta$  no W.

Na základě výše zmíněných tvrzení, které interpretují výsledky vazebné eseje k ověření vazebných vlastností proteinu 14-3-3 $\zeta$  no W, lze konstatovat, že protein 14-3-3 $\zeta$  no W exprimovaný prokaryotním exprimačním systémem a purifikovaný popsány metodami se váže na fosforylovaný protein FoxO4<sub>11-213</sub> fin W a lze ho tedy použít k dalším pokusů s tímto proteinem.

## 6 Diskuse

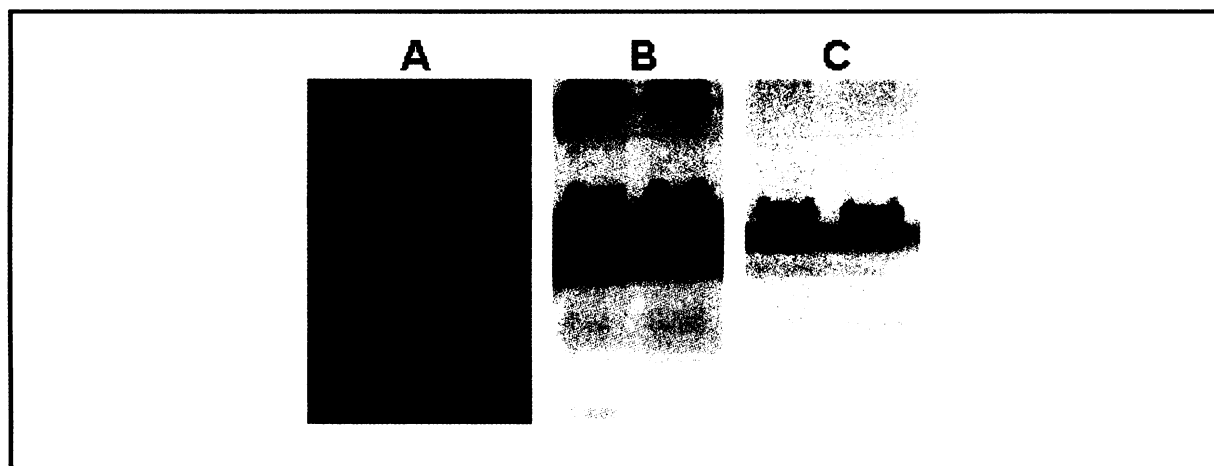
### 6.1 Příprava mutantní formy proteinu FoxO4<sub>11-213</sub>

Sledování strukturních změn metodami stacionární a časově rozlišené fluorescence vyžaduje ve struktuře proteinu element, na kterém je možné fluorescenci sledovat. Proteiny obsahují tři přirozené fluorofory: tryptofan, tyrozin a fenylalanin. Studium tryptofanové fluorescence je nejefektivnější a to ze tří důvodů: (1) četnost tryptofanových zbytků ve struktuře proteinů je malá, (2) fluorescence fenylalaninu má malý kvantový výtěžek, (3) fluorescence tyrozinových zbytků je velmi často efektivně zhašena a současně je-li fluorescence tryptofanových zbytků měřena po excitaci zářením o vlnové délce 295 nm, nedochází k excitaci tyrozinu. [79]. Přestože protein FoxO4<sub>11-213</sub> vyhovuje tvrzení, že četnost tryptofanových zbytků v jeho struktuře je malá, v celé sekvenci jich obsahuje pět, což pro analýzu výsledků tryptofanové fluorescence je stále velký počet. Ideálním počtem pro analýzu výsledků by byl jeden tryptofan. Předchozí experimenty prováděné na samotné DNA-vazebné doméně FoxO4<sub>82-207</sub> ukázaly, že všechny tryptofanové zbytky kromě Trp-173 a Trp-174 lze zmutovat na Phe aniž by došlo ke ztrátě schopnosti vázat DNA[89]. Proto bylo možné odstranit pouze tři z těchto pěti tryptofanových zbytků. Jednalo se o tryptofanové zbytky na pozicích 29, 97 a 126.

K odstranění těchto tryptofanů, respektive k jejich záměně na fenylalaninové zbytky bylo použito cílené mutagenese DNA kódující tento protein. Nejednalo se tedy přímo o chemickou přeměnu jedné aminokyseliny ve druhou, ale o mutaci DNA kódující protein FoxO4<sub>11-213</sub>. Postupnými cílenými mutacemi (viz kapitola 4.1) byly zaměněny kodony pro tryptofan (TGG) na kodony pro fenylalanin (TTC). Tyto mutace byly provedeny postupně. Nejprve byl zmutován kodon pro tryptofan na pozici 97. Jako templát byla použita plazmidová DNA kódující protein FoxO4<sub>11-213</sub> (příloha 1) poskytnutá Dr. T. Obšilem. Následovala mutagenese tryptofanového kodonu na pozici 126. Pro tuto mutagenesi byla použita plazmidová DNA připravená předchozí mutagenesí a ověřená sekvenací. Nakonec byl zmutován i kodon pro tryptofan na pozici 29, opět s použitím sekvenací ověřené DNA z předchozí mutagenese. Tímto postupem byla připravena plazmidová DNA kódující úsek proteinu FoxO4 od 11. do 213. aminokyselinového zbytku s mutacemi kodonů pro tryptofan na kodony pro fenylalanin na pozicích 29, 97 a 126. Záznam sekvenátoru po poslední mutagenesi (viz obr. 5.2 kapitola 5.1.5, nebo příloha 5) potvrzuje, že připravená DNA obsahuje tyto změny a zároveň nebyla poškozena jinými mutacemi. Protein kódovaný touto DNA jsem označil jako FoxO4<sub>11-213</sub> fin W.

## 6.2 Exprese a purifikace FoxO4<sub>11-213</sub> fin W

Úkolem další fáze práce bylo připravit v dostatečném množství co nejčistší protein FoxO4<sub>11-213</sub> fin W. Exprese proteinu spočívala v napěstování bakteriální kultury a indukci exprese proteinu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W v bakteriálních buňkách (viz kapitola 4.2.1). Při purifikaci bylo nutné převést veškerý obsah buňky do roztoku (viz kapitola 4.2.2.1) a provést několik purifikačních kroků, které separují proteiny na základě různých kritérií. Klíčovým krokem této purifikace byla GST afinitní chromatografie (viz kapitola 4.2.2.2), při které byl roztok proteinu zbaven velké části kontaminujících proteinů (viz kapitola 5.2.3, obr. 5.3, nebo obr. 6.1 výřez A). K dalšímu zvýšení čistoty došlo při kationtově výměnné chromatografii (viz kapitola 4.2.2.5). Ani po této purifikační metodě ovšem protein neměl požadovanou čistotu, obsahoval příměs degradačních produktů (viz kapitola 5.2.5, obr. 5.6, nebo obr. 6.1 výřez B). Použil jsem tedy ještě jako další purifikační metodu gelovou filtraci (4.2.2.7), která odděluje proteiny na základě jejich molekulové hmotnosti. Touto metodou bylo dosaženo požadované čistoty proteinu a purifikace mohla být považována za dokončenou (viz kapitola 5.2.6, obr. 5.9, nebo obr. 6.1 výřez C).

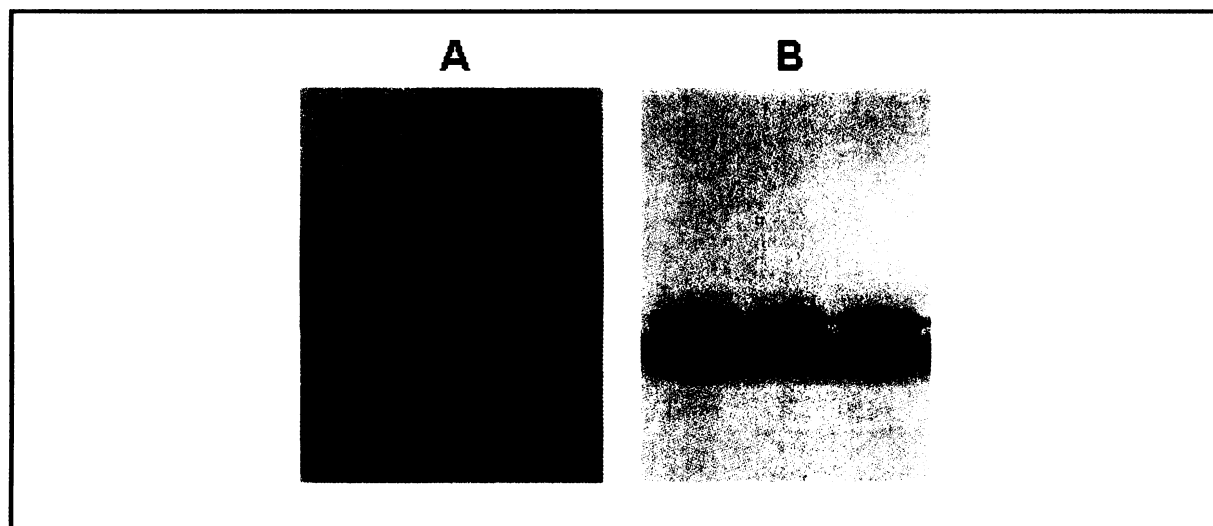


**Obr. 6.1 Srovnání čistoty proteinu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W po hlavních purifikačních krocích.** Podle intenzity vizualizace nelze příliš srovnávat vzorky z rozdílných gelů co do koncentrace proteinu ve vzorku. Intenzita vizualizace závisí rovněž na množství nanášeného vzorku, které se může v jednotlivých případech lišit. Pozorovat lze ovšem úbytek nečistot v nanášených vzorcích.

### 6.3 Exprese a purifikace 14-3-3 $\zeta$ no W

Příprava čistého proteinu 14-3-3 $\zeta$  no W byla dalším cílem mé diplomové práce. Protein 14-3-3 $\zeta$  je přirozeným vazebným partnerem proteinu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W. Mutantní forma tohoto proteinu – 14-3-3 $\zeta$  no W je upravena mutacemi tak, aby neobsahovala žádný tryptofanový zbytek, který by interferoval s tryptofanovými fluorescenčními měřeními interakce FoxO4<sub>11-213</sub> fin W s tímto proteinem. Exprese a purifikace 14-3-3 $\zeta$  no W je relativně snazší než u FoxO4<sub>11-213</sub> fin W. Tento protein je daleko méně citlivý k proteolytické degradaci a jeho příprava slibuje daleko větší výtěžek než příprava FoxO4<sub>11-213</sub> fin W. Navíc purifikace proteinů, exprimovaných s His-tag afinitní kotvou, niklovou chelatační chromatografií je vysoce účinná a většinou odstraní převážnou část nečistot.

Také při přípravě 14-3-3 $\zeta$  no W jsem postupoval podle ověřených purifikačních protokolů. Po expresi proteinu (viz kapitola 4.3.1) a sonikaci (viz kapitola 4.2.2.1) byl protein purifikován niklovou chelatační chromatografií (viz kapitola 4.3.2.1), která odstranila z roztoku většinu nečistot (viz kapitola 5.3.3, obr. 5.11, nebo obr.6.2 výřez A). Další purifikační metodou, kterou byla aniontově výměnná chromatografie (viz kapitola 4.3.2.3) došlo k odstranění zbylých nečistot a protein mohl být považován za dostatečně čistý (viz kapitola 5.3.5, obr. 5.12, nebo obr. 6.2 výřez B).



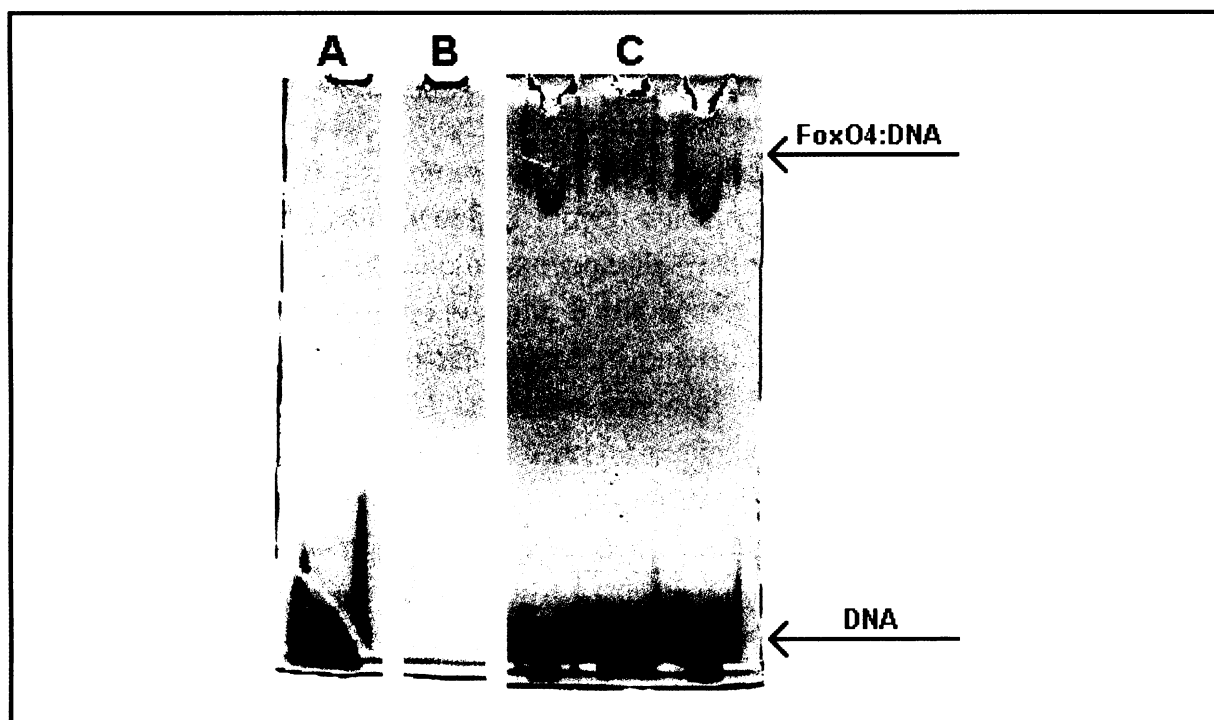
**Obr. 6.2 Srovnání čistoty proteinu 14-3-3 $\zeta$  no W po hlavních purifikačních krocích.** O intenzitě vizualizace platí to samé jako v poznámce k obr. 6.1. Dále je z tohoto obrázku patrné, že čistota proteinu byla vysoká již po niklové chelatační chromatografii. Přesto jsme aniontově výměnnou chromatografií docílili ještě vyšší čistoty.

## 6.4 Ověření vazebných vlastností purifikovaných proteinů

Ověření vazebných vlastností proteinů bylo velmi důležitým krokem jejich přípravy. V závěrečné fázi purifikace proteinů jsem pomocí SDS-PAGE ověřil pouze přítomnost a čistotu proteinu v roztoku. Ověřením vazebných vlastností metodou EMSA (viz kapitola 4.4.1) jsem ovšem ověřil, že připravený protein neztratil během mutagenese, exprese a purifikace vazebné vlastnosti vzhledem k vazebným partnerům, se kterými budou probíhat následné pokusy.

### 6.4.1 Ověření DNA vazebných vlastností FoxO4<sub>11-213</sub> fin W

K tomuto ověření byla použita metoda EMSA s následujícím uspořádáním vzorků: (A) vzorek obsahující pouze DNA, (B) vzorek obsahující pouze protein, (C) vzorky obsahující DNA a protein v různých molárních poměrech.



**Obr. 6.3 12% TBE gel vazebné eseje DNA a FoxO4<sub>11-213</sub> fin W.** Na výřezu C je obarvena pouze volná DNA. Na výřezu B nedošlo k žádnému obarvení, protože vzorek obsahoval pouze protein. Na výřezu C je patrný posun (shift) elektromigrační pozice volné DNA oproti komplexu protein:DNA.

Výsledky vizualizace gelu lze analyzovat následujícím způsobem. Vzorek A potvrdil, že barvením stříbrem je vizualizována DNA a určil její elektromigrační pozici. Vzorek B potvrdil, že použitím uvedené metody pro vizualizaci DNA nedochází k obarvení samotného proteinu. Vzorky C ukázaly, že na gelu se objevila dvě vizualizovaná místa, z nichž jedno patří volné DNA. Z elektromigrační pozice druhého místa vyplývá, že velikost této molekuly musela být velmi zvětšena. K tomu mohlo v tomto případě dojít jedině vytvořením komplexu protein:DNA. Závěr z této analýzy je, že ve vzorcích C došlo k vytvoření komplexu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W:DNA, což ukazuje na skutečnost, že mutovaná verze FoxO4<sub>11-213</sub> fin W má schopnost vázat DNA.

## 6.4.2 Ověření vazebných vlastností 14-3-3ζ no W

K ověření vazebných vlastností 14-3-3ζ no W jsem rovněž použil metody EMSA. Protein 14-3-3ζ no W ovšem netvoří komplex s DNA a proto byly jeho vazebné vlastnosti ověřovány nepřímo. Teze tohoto ověření zní: pokud ve vzorku obsahujícím DNA, 14-3-3ζ no W a dpFoxO4<sub>11-213</sub> fin W (dp = dvojitě fosforylovaný) nedochází k vytvoření komplexu DNA:dpFoxO4<sub>11-213</sub> fin W, bylo této interakci zabráněno vytvořením komplexu dpFoxO4<sub>11-213</sub> fin W:14-3-3ζ no W [77]. Toto tvrzení muselo být ovšem ještě podpořeno důkazem, že nejen FoxO4<sub>11-213</sub> fin W, ale také dpFoxO4<sub>11-213</sub> fin W tvoří komplex s DNA. Celkově se nejednalo o příliš složitější proces než při ověřování DNA vazebných vlastností FoxO4<sub>11-213</sub> fin W, pouze složení vzorků muselo být trochu komplikovanější. Pokusím se nyní ještě jednou rozebrat výsledky této vazebné eseje (viz obr. 5.15).

První dráha určila elektromigrační polohu volné DNA. Druhá dráha vyloučila vizualizaci FoxO4<sub>11-213</sub> fin W barvením stříbrem. Třetí dráha potvrdila DNA vazebné vlastnosti FoxO4<sub>11-213</sub> fin W. Čtvrtá dráha ukázala, že protein 14-3-3ζ no W netvoří komplex s nefosforylovaným FoxO4<sub>11-213</sub> fin W, ten je tudíž k dispozici pro vytvoření komplexu s DNA. Pátá dráha vyloučila vizualizaci dpFoxO4<sub>11-213</sub> fin W touto metodou. Šestá dráha ukázala, že i dpFoxO4<sub>11-213</sub> fin W tvoří komplex s DNA. Konečně sedmá dráha ukázala, že v přítomnosti 14-3-3ζ no W se netvoří komplex dpFoxO4<sub>11-213</sub> fin W:DNA. Z těchto dílčích závěrů lze vyvodit, že vazebné vlastnosti připraveného proteinu 14-3-3ζ no W odpovídají přírodní formě tohoto proteinu, neboť se neváže na nefosforylovaný FoxO4 protein a zároveň svou interakcí s fosforylovanou formou tohoto proteinu zabraňuje jeho interakci s DNA.



## 7 Souhrn výsledků

1. Cílenými mutacemi DNA kódující protein FoxO4<sub>11-213</sub> se podařilo připravit mutantní DNA kódující protein FoxO4<sub>11-213</sub> s mutacemi tryptofanových kodonů (TGG) v kodony pro fenylalanin (TTC) na pozicích 29, 97 a 126.
2. Expresí a purifikací proteinu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W se podařilo získat 2,69 mg tohoto proteinu vyhovující čistoty.
3. Expresí a purifikací proteinu 14-3-3 $\zeta$  no W se podařilo získat 38,7 mg tohoto proteinu vyhovující čistoty.
4. Vazebná esej vypurifikovaného proteinu FoxO4<sub>11-213</sub> fin W prokázala, že tvoří komplex s DNA.
5. Vazebná esej vypurifikovaného proteinu 14-3-3 $\zeta$  no W prokázala, že tvoří komplex s fosforylovaným proteinem FoxO4<sub>11-213</sub> fin W. Vazba 14-3-3 proteinu na fosforylovaný FoxO4<sub>11-213</sub> fin W inhibuje jeho interakci s DNA.

## 8 Závěr

Závěrem bych chtěl uvést, že v průběhu experimentální části této práce se mi podařilo dosáhnout vytyčeného cíle a připravit sadu proteinů pro tryptofanová fluorescenční měření konformačních změn DNA vazebné domény transkripčního faktoru FoxO4 při interakci s DNA, respektive se 14-3-3 $\zeta$  proteinem. Tento výsledek se stal součástí projektu, který je zaměřen na detailní poznání interakce transkripčního faktoru FoxO4 s jeho vazebnými partnery.

Skutečnost, že i já jsem mohl přispět svým malým dílem do tohoto dlouhodobého projektu pro mě byla velmi motivující a inspirující. Přínosem pro mě bylo především osvojení mnoha technik a metod využívaných při práci v laboratoři biochemie, či fyzikální chemie a osvojení způsobu práce vyžadující pečlivost, přesnost a trpělivost. Zajímavé pro mě bylo proniknutí do podstaty používaných technik a metod, které mi ukázalo jiný rozměr práce se znalostmi nabytými při studiu. Člověk při běžném studiu bere některá fakta jako daná a hotová a dále s nimi nepracuje. Ale ve chvíli, kdy na tyto skutečnosti pohlížíte jako na podstatu metody, která vás ve vaší práci posune o krok dál, stane se tato znalost aktivní a číhá ve vás na chvíli, kdy se bude opět hodit. Tímto způsobem bylo ve mně transformováno mnoho pasivních vědomostí týkajících se například struktury a vlastností proteinů. Kromě toho jsem si splnil i svá osobní očekávání, týkající se nahlédnutí do vědecké práce, osvojení práce s některými laboratorními přístroji a hlavně osvojení způsobu práce a chování v laboratoři.

## 9 Seznam citované literatury

1. Tran, H., Brunet, A., Griffith, E.C., Greenberg M.E. (2003) The many forks in FoxO's road. *Sci STKE*.
2. 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. (2003) FoxO6, a Novel Member of the FoxO Class of Transcription Factors with Distinct Shuttling Dynamics. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 35959-35967.
3. Clark, K.L., Haley, E.D., Lai, E.S., Burely, S.K. (1993) Co-Crystal Structure of the HNF-3/Fork Head DNA-Recognition Motif Resembles Histone-H5. *NATURE* **364**: 412-420.
4. Wiegel, D., Jakle, H. (1990) The fork head domain: A novel DNA binding motif of eucaryotic transcription faktors? *Cell* **63**: 455-456.
5. Hillion, M., Le Cinkat, P., Jonveaux, R., Berger, O.A. (1997) AF6q21, a novel partner of MLL gene in t(6;11)(q21;q23), defines a forkhead transcriptional factor subfamily. *Blood* **90**: 3714-3719.
6. Anderson, M.J., Viars, C.S., Czekay, S., Cavenee, W.K., Arden, K.C (1998) Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily. *Genomics* **47**: 187-19.
7. van der Heide, L.P., Hoekman, M.F.M., Smidt, M.P (2004) The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcription regulation. *Biochem.J.* **380**: 297-309.
8. Ramaswamy, S., Nakamura, N., Sansal, I., Bergeron, L., Sellers, W.R. (2002) A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell* **2**: 81-91.
9. Schuur, E.R., Loktev, A.V., Sharma, M., Sun, Z.J., Roth, R.A., Weigel, R.J. (2001) Ligand-dependent interaction of estrogen receptor-alpha with members of the forkhead transcription factor family. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 33554-33560.
10. Woods, Y.L., Rena, G., Morrice, N., Barthel, A., Becker, W., Guo, S.D., Unterman, T.G., Cohen, P. (2001) The kinase DYRK1A phosphorylates the transcription factor FKHR at Ser(329) in vitro, a novel in vivo phosphorylation site. *Biochemical journal* **355**: 597-607.
11. Woods, Y.L., Rena, G. (2002) Effect of multiple phosphorylation events on the transcription factors FKHR, FKHLI and AFX. *Biochemical society transaction* **30**: 391-397.
12. Toker, A., Cantley, L.C. (1997) Signalling through the lipid products of Phoinositide-3-OH kinase. *Nature* **387**: 673-676.
13. Alessi, D., Claudweell, F., Andrejelkovic, M., Hemmings, B., Cohen, P. (1996) Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparasion with Mapkap kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS letters* **399**, 333-338.
14. Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenish, J., Greenberg, M.E. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**: 857-868 .
15. Kops, G.J., de Ruiter, N.D., De Vries-Smith, A.M., Powell, D.R., Bos, J.L., Burgering, B.M. (1999) Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* **398**, 630-634.

16. Takaishi, H., Konishi, H., Matsuzaki, H., Ono Y., Shirai, Y., Saito, N., Kitamura T., Ogawa, W., Kasuga, M., Kikkawa, U., Nishizuka, Y. (1999) Regulation of nuclear translocation of Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA* **96**: 11836-11841.
17. Brownawell, A.M., Kops, G.J.P.L., Macara, I.G., Burgering, B.M.T. (2001) Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. *Molecular and Cellular Biology* **21**: 3534-3546.
18. Burgering, B.M.T., Medema, R.H. (2003) Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *Journal of leukocyte biology* **73**: 689-701.
21. De Ruiter, N.D., Burgering, B.M.T., Bos, J.L. (2001) Regulation of the forkhead transcription factor AFX by Raf-dependent phosphorylation of threonines 447 and 451. *Molecular and Cellular Biology* **21**: 8225-8235.
22. Biggs, W.H., Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W.K., Arden, K.C. (1999) Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA* **96**: 7421-7426.
23. Zhao, X., Gan, L., Pan, H., Kan, D., Majeski, M., Adam, S.A., Unterman, T.G. (2004) Multiple elements regulate nuclear/cytoplasmic shuttling of FoxO1: characterization of phosphorylation- and 14-3-3-dependent and independent mechanisms. *Biochemical Journal* **378**: 839-849.
24. Rena, G., Prescott, A.R., Guo, S.D., Cohen, P., Unterman, T.G. (2001) Roles of the forkhead in rhabdomyosarcoma (FKHR) phosphorylation sites in regulating 14-3-3 binding, transactivation and nuclear targeting. *Biochemical Journal* **354**: 605-612.
25. Rena, G., Bain, J., Elliott, M., Cohen, P. (2004) D4476, a cell-permeant inhibitor of CK1, suppresses the site-specific phosphorylation and nuclear exclusion of FOXO1a. *Embo reports* **5** : 60-65.
26. Brunet, A., Kanai, F., Stehn, J., Xu, J., Sarbassova, D., Frangioni, J.V., Dalal, S.N., DeCaprio, J.A., Greenberg, M.E., Yaffe, M.B. (2002) 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *Journal of cell biology* **156**: 817-828.
27. Yaffe, M.B. (2002) How do 14-3-3 proteins work? - Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *Febs letters* **513** : 53-57.
28. Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J., Cantley, L.C. (1997) The structural basis for 14-3-3 : phosphopeptide binding specificity. *Cell* **91**: 961-971.
29. Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M., Shaw, A.S. (1996) Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* **84**: 889-897.
30. Plas, D.R., Thompson, C.B. (2003) Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 12361-12366.
31. Tang, E.D., Nunez, G., Barr, F.G., Guan, K.L. (1999) Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 16741-16746.
32. Coffey, P.J., Dijkers, P.F., Lam, E.W.F., Lammers, J.W.J., Koenderman, L. (2001) The forkhead transcription factor FKHR-L1 is a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal. *Blood* **98** : 758A-758A 3157.
33. Dijkers, P.F., Medema, R.H., Pals, C., Banerji, L., Thomas, N.S.B., Lam, E.W.F., Burgering, B.M.T., Raaijmakers, J.A.M., Lammers, J.W.J., Koenderman, L., Coffey, P.J. (2000) Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). *Molecular and cellular biology* **20**: 9138-9148.
34. Dijkers, P.F., Medema, R.H., Lammers, J.W.J., Koenderman, L., Coffey, P.J. (2000) Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Current biology* **10**: 1201-1204.

- 35 Stahl, M., Dijkers, P.F., Kops, G.J.P.L., Lens, S.M.A., Coffe, P.J., Burgering, B.M.T., Medema, R.H. (2002) The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27(Kip1) and bim in response to IL-2. *Journal of immunology* **168**: 5024-5031.
- 36 Alvarez, B., Martinez, C., Burgering, B.M.T., Carrera, A.C. (2001) Forkhead transcription factors contribute to execution of the mitotic programme in mammals. *Nature* **413**: 744-747.
- 37 Siegel, R.M., Chan, F.K.M., Chun, H.J., Lenardo, M.J. (2000) The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nature immunology* **1**: 469-474.
- 38 Tang, T.T.L., Dowbenko, D., Jackson, A., Toney, L., Lewin, D.A., Dent, A.L., Lasky, L.A. (2002) The forkhead transcription factor AFX activates apoptosis by induction of the BCL-6 transcriptional repressor. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 14255-14265.
- 39 Kops, G.J.P.L., Medema, R.H., Glassford, J., Essers, M.A.G., Dijkers, P.F., Coffe, P.J., Lam, E.W.F., Burgering, B.M.T. (2002) Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated Forkhead transcription factors. *Molecular and cellular biology* **22**: 2025-2036.
- 40 Medema, R.H., Kops, G.J.P.L., Bos, J.L., Burgering, B.M.T. (2000) AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27(kip1). *Nature* **404**: 782-787.
- 41 Nakamura, N., Ramaswamy, S., Vazquez, F., Signoretti, S., Loda, M., Sellers, W.R. (2000) Forkhead transcription factors are critical effectors of cell death and cell cycle arrest downstream of PTEN. *Molecular and cellular biology* **20**: 8969-8982.
- 42 Schmidt, M., de Mattos, S.F., van der Horst, A., Klompaker, R., Kops, G.J.P.L., Lam, E.W.F., Burgering, B.M.T., Medema, R.H. (2002) Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Molecular and cellular biology* **22**: 7842-7852.
- 43 Tran, H., Brunet, A., Grenier, J.M., Datta, S.R., Fornace, A.J., DiStefano, P.S., Chiang, L.W., Greenberg, M.E. (2002) DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* **296**: 530-534.
- 44 Furukawa-Hibi, Y., Yoshida-Araki, K., Ohta, T., Ikeda, K., Motoyama, N. (2002) FOXO forkhead transcription factors induce G(2)-M checkpoint in response to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 26729-26732.
- 45 Glover, D.M., Hagan, I.M., Tavares, A.A.M. (1998) Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis. *Genes & Development* **12** : 3777-3787.
- 46 Kotani, S., Tanaka, H., Yasuda, H., Todokoro, K. (1999) Regulation of APC activity by phosphorylation and regulatory factors. *Journal of cell biology* **146**: 791-800.
- 47 Nemoto, S., Finkel, T. (2002) Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science* **295**: 2450-2452.
- 48 Kops, G.J.P.L., Dansen, T.B., Polderman, P.E., Saarloos, I., Wirtz, K.W.A., Coffe, P.J., Huang, T.T., Bos, J.L., Medema, R.H., Burgering, B.M.T. (2002) Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* **419**: 316-321.
- 49 Shields, J.M., Pruitt, K., McFall, A., Shaub, A., Der, C.J. (2000) Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends in cell biology* **10**: 147-154.
- 50 Shapiro, D.N., Sublett, J.E., Li, B.T., Downing, J.R., Naeve, C.W. (1993) Fusion of PAX3 to a member of the forkhead family of transcription factors in human alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer research* **53**: 5108-5112.

- 51 Corral, J., Forster, A., Thompson, S., Lampert, F., Kaneko, Y., Slater, R., Kroes, W.G., Vanderschoot, C.E., Ludwig, W.D., Karpas, A., Pocock, C., Cotter, F., Rabbitts, T.H. (1993) Acute leukemias of different lineages have similar MLL gene fusion encoding related chimeric proteins resulting from chromosomal translocation. *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA* **90**: 8538-8542 .
- 52 Parry, P., Weiyel, Y.L., Evans, G. (1994) Cloning and characterization of the (XII) breakpoint from a leukemic-cell line identify a new member of the forkhead gene family. *Genes chromosomes & cancer* **11**: 79-84.
- 53 Davis, R.J., Bennicelli, J.L., Macina, R.A., Nycum, L.M., Biegel, J.A., Barr, F.G. (1995) Structural characterization of the FKHR gene and its rearrangement in aleveolar rhabdomyosarcoma. *Human molecular genetics* **4**: 2355-2362.
- 54 Nakae, J., Kitamura, T., Silver, D.L., Accili, D. (2001) The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *Journal of Clinical Investigation* **108**: 1359-1367.
- 55 Kitamura, T., Nakae, J., Kitamura, Y., Kido, Y., Biggs, W.H., Wright, C.V.E., White, M.F., Arden, K.C., Accili, D. (2002) The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth. *JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION* **110**: 1839-1847.
- 56 Schmoll, D., Walker, K.S., Alessi, D.R., Grempler, R., Burchell, A., Guo, S.D., Walther, R., Unterman, T.G. (2000) Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase B alpha and the forkhead transcription factor FKHR - Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. *Journal of clinical investigation* **275** : 36324-36333.
- 57 Hall, R.K., Yamasaki, T., Kucera, T., Waltner-Law, M., O'Brien, R., Granner, D.K. (2000) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression by insulin - The role of winged helix/forkhead proteins. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 30169-30175.
- 58 Yeagley, D., Guo, S.D., Unterman, T., Quinn, P.G. (2001) Gene- and activation-specific mechanisms for insulin inhibition of basal and glucocorticoid-induced insulin-like growth factor binding protein-1 and phosphoenolpyruvate carboxykinase transcription - Roles of forkhead and insulin response sequences. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 33705-33710.
- 59 Moor, B.W., Perez, V.J. (1969) Physiological and biochemical aspects of nervous integration: 343-359.
- 60 Obšil, T., Ghirlando, R., Klein, D.C., Ganguly, S., Dyda, F. (2001) Crystal structure of the 14-3-3 zeta : serotonin N-acetyltransferase complex: A role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell* **105**: 257-267.
- 61 Aitken, A., Collinge, D.B., Vanheusden, B.P.H., Isobe, T., Roseboom, P.H., Rosenfeld, G. (1992) 14-3-3 proteins a highly conserved, widespread family of eucaryotic family of eucaryotic proteins. *Trends in biochemical sciencis* **17**: 498-501.
- 62 Ferl, R.J. (2004) 14-3-3 proteins: regulation of signal-induced events. *Physiologi plantarum* **120**: 173-178.
- 63 Hermeking, H. (2003) The 14-3-3 cancer connection. *Nature reviews cancer* **3**: 931-943.
- 64 DeLille, J.M., Sehnke, P.C., Ferl, R.J. (2001) The arabidopsis 14-3-3 family of signaling regulators. *iPlant physiology* **126** : 35-38.
- 65 Cahill, C.M., Tzivion, G., Nasrin, N., Ogg, S., Dore, J., Ruvkun, G., Alexander-Bridges, M. (2000) DAF-16 recruits the CREB-binding protein coactivator complex to the insulin-like growth factor binding protein 1 promoter in HepG2 cells. *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA* **97**: 10412-10417.
- 66 van Hemert, M.J., van Heusden, G.P.H., Steensma, H.Y. (2001) Yeast 14-3-3 proteins. *Yeast* **18**: 889-895.

- 67 van Hemert, M.J., de Steensma, H.Y., van Heusden, G.P.H. (2001) 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* **23**: 936-946.
- 68 Liu, D., Bienkowska, J., Petosa, C., Collier, R.J., Fu, H., Liddington, R. (1995) Crystal-structure of the zeta-isoforms of the 14-3-3 protein. *Nature* **376**: 191-194.
- 69 Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.C. Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1997) 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Molecular cell* **1**: 3-11.
- 70 Ford, J.C., Alkhodairy, F., Fotou, E., Sheldrick, K.S., Griffiths, D.J.F., Carr, A.M. (1994) 14-3-3 protein Homolova required for DNA-damage checkpoint in fission yeast. *Science* **265**: 533-535.
- 71 Tzivion, G., Avruch, J. (2002) 14-3-3 proteins: Active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 3061-3064.
- 72 Muslin, A.J., Xing, H.M. (2000) 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cellular signalling* **12**: 703-709.
- 73 Cahill, C.M., Tzivion, G., Nasrin, N., Ogg, S., Dore, J., Ruvkun, G., Alexander-Bridges, M. (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase signaling inhibits DAF-16 DNA binding and function via 14-3-3-dependent and 14-3-3-independent pathways. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 13402-13410.
- 74 So, C.W., Cleary, M.L. (2003) Common mechanism for oncogenic activation of MLL by forkhead family proteins. *Blood* **101**: 633-639.
- 75 So, C.W., Cleary, M.L. (2002) MLL-AFX requires the transcriptional effector domains of AFX to transform myeloid progenitors and transdominantly interfere with forkhead protein function. *Molecular and cellular biology* **22**: 6542-6552.
- 76 Weigelt, J., Kliment, I., Dahlman-Wright, K., Wikstöm, M. (2001) Solution structure of the DNA binding domain of the human forkhead transcription factor AFX (FoxO4). *Biochemistry* **40**: 5861-5869.
- 77 Obsil, T., Ghirlando, R., Anderson, D.E., Hickman, A.B., Dyda, F. (2003) Two 14-3-3 binding motifs are required for stable association of forkhead transcription factor FOXO4 with 14-3-3 proteins and inhibition of DNA binding. *Biochemistry* **42**: 15264-15272.
- 79 Miller, M., Denicola, A. (2002) Protein tryptophan accessibility studied by fluorescence quenching. *Biochemistry and molecular biology education* **30**: 175-178.
- 84 Barr, F.G. (2001) Gene fusion involving PAX and FOX family members of alveolar rhabdomyosarcoma. *Onkogene* **20**, 5736-5746.
- 85 Scheidler, S. et al. (1996) The hybrid PAX3-FKHR fusion protein of alveolar rhabdomyosarcoma transforms fibroblast in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 9805-9809.
- 86 Obsilova, V., Vecer, J., Herman, P., Pabianova, A., Sulc, M., Teisinger, J., Boura, E., Obsil, T. (2005) 14-3-3 protein interacts with nuclear localization sequence of forkhead transcription factor FoxO4. *Biochemistry* **44**, 11608-11617.
- 87 Burgering, B.M.T., Kops, G.J.P.L. (2002) Cell cycle and death control: long live forkhead *Trends in Biochemical sciences* Vol. **27** No.7.
- 88 Lucast, T.L., Batey, R.T., and Doudna, J.A. (2001) Large-scale purification of a stable form of recombinant tobacco etch virus protease. *Biotechniques* **30**: 544-550.
- 89 Pabianova, A. (2005) Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta UK

# 10 Přílohy

## Příloha 1

### Aminokyselinová sekvence proteinu FoxO4<sub>11-213</sub> (W29,97,126,173,174)

```

I11 I D L D
atc ata gac cta gat

P D F E P Q S R P R S C T W P
ccc gac ttc gaa ccc cag agc cgt ccc cgc tcc tgc acc tgg ccc

L P R P E I A N Q P S E P P E
ctt ccc cga cca gag atc gct aac cag ccg tcc gag ccg ccc gag

V E P D L G E K V H T E G R S
gtg gag cca gat ctg ggg gaa aag gta cac acg gag ggg cgc tca

E P I L L P S R L P E P A G G
gag ccg atc ctg ttg ccc tct cgg ctc cca gag ccg gcc ggg ggc

P Q P G I L G A V T G P R K G
ccc cag ccc gga atc ctg ggg gct gta aca ggt cct cgg aag gga

G S R R N A W G N Q S Y A E L
ggc tcc cgc cgg aat gcc tgg gga aat cag tca tat gca gaa ctc

I S Q A I E S A P E K R L T L
atc agc cag gcc att gaa agc gcc ccg gag aag cga ctg aca ctt

A Q I Y E W M V R T V P Y F K
gcc cag att tac gag tgg atg gtc cgt act gta ccc tac ttc aag

D K G D S N S S A G F K N S I
gac aag ggt gac agc aac agc tca gca gga ttc aag aac tcg atc

R H N L S L H S K F I K V H N
cgc cac aac ctg tcc ctg cac agc aag ttc atc aag gtt cac aac

E A T G K S S W W M L N P E G
gag gcc acc ggc aaa agc tct tgg tgg atg ctg aac cct gag gga

G K S G K A P R R R A A S M D
ggc aag agc ggc aaa gcc ccc cgc cgc cgg gcc gcc tcc atg gat

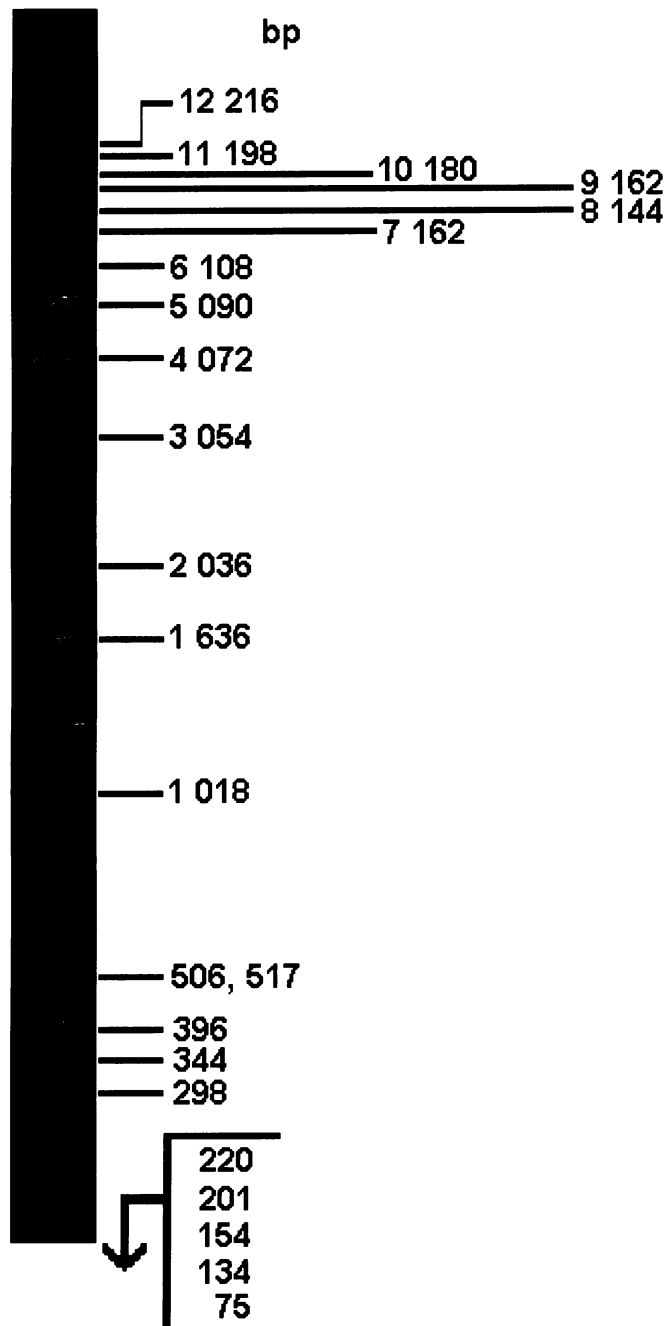
S S S K L L R G R S K A P K K
agc agc agc aag ctg ctc cgg ggc cgc agt aaa gcc ccc aag aag

K P S
aaa cca tct
```



## Příloha 2

### 1 Kb DNA Ladder (*Invitrogen, USA*)



1 Kb DNA Ladder  
0,5 g/lane  
0,9% agarose gel  
stained with ethidium bromide

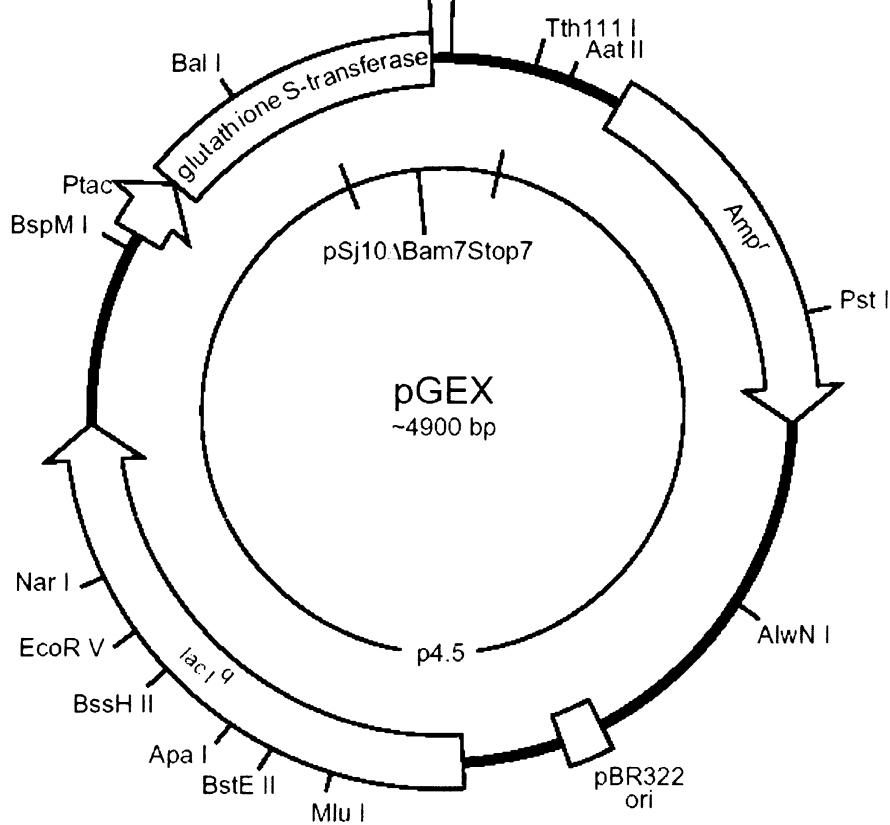
### Příloha 3

#### Vektor pGEX- 4T-1 (*Amersham Biosciences, Švédsko*)

##### pGEX-4T-1 (27-4580-01)

Thrombin

Leu	Val	Pro	Arg	Gly	Ser	Pro	Glu	Phe	Pro	Gly	Arg	Leu	Glu	Arg	Pro	His	Arg	Asp	
CTG	GTT	CCG	CGT	GGA	TCC	CCG	GAA	TTC	CCG	GGT	CGA	CTC	GAG	CGG	CCG	CAT	CGT	GAC	TGA
				BamH I		EcoR I		Sma I		Sal I		Xho I		Not I					Stop codons

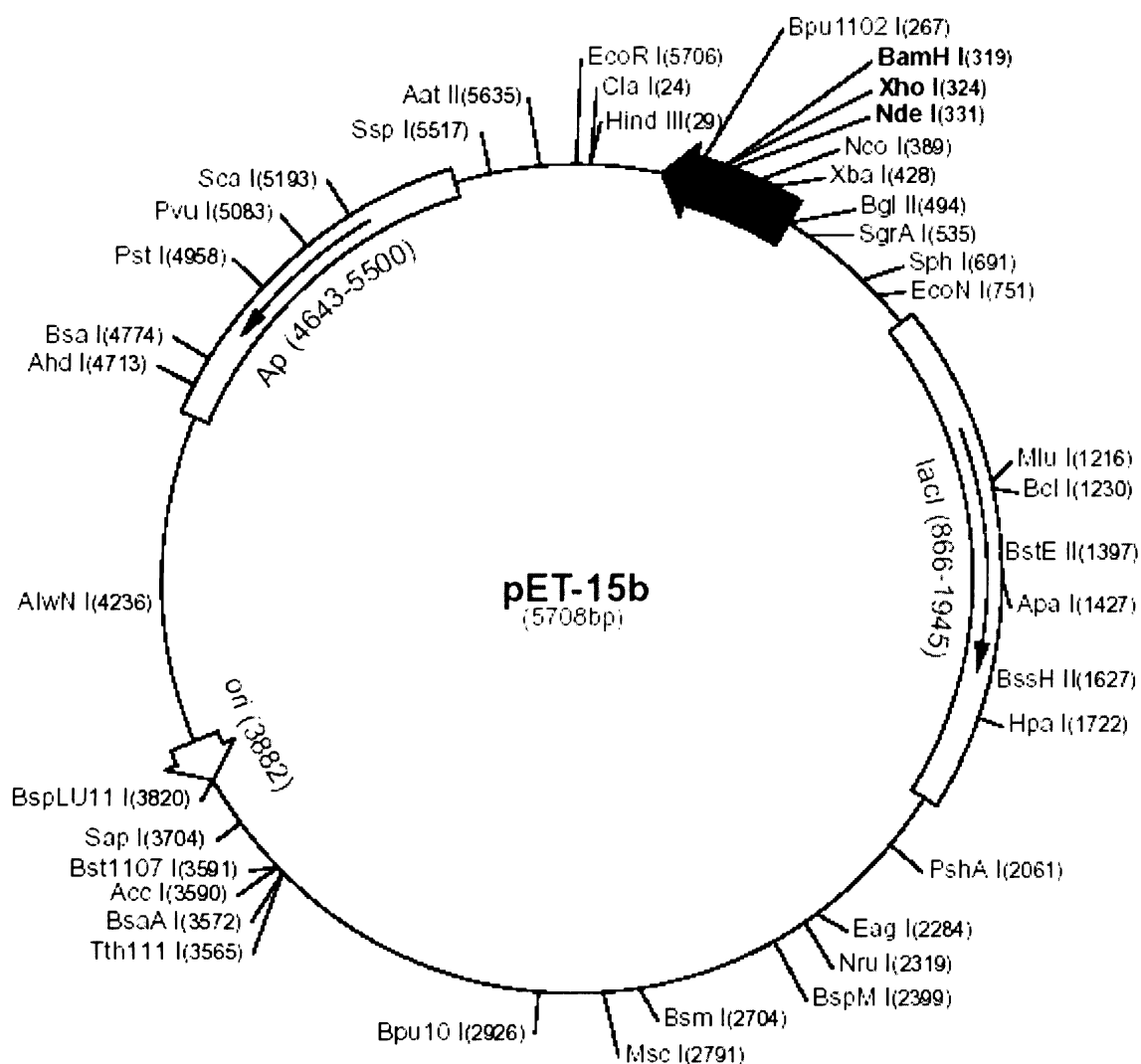


## Příloha 4

### Vektor pET-15b (Novagen, USA)

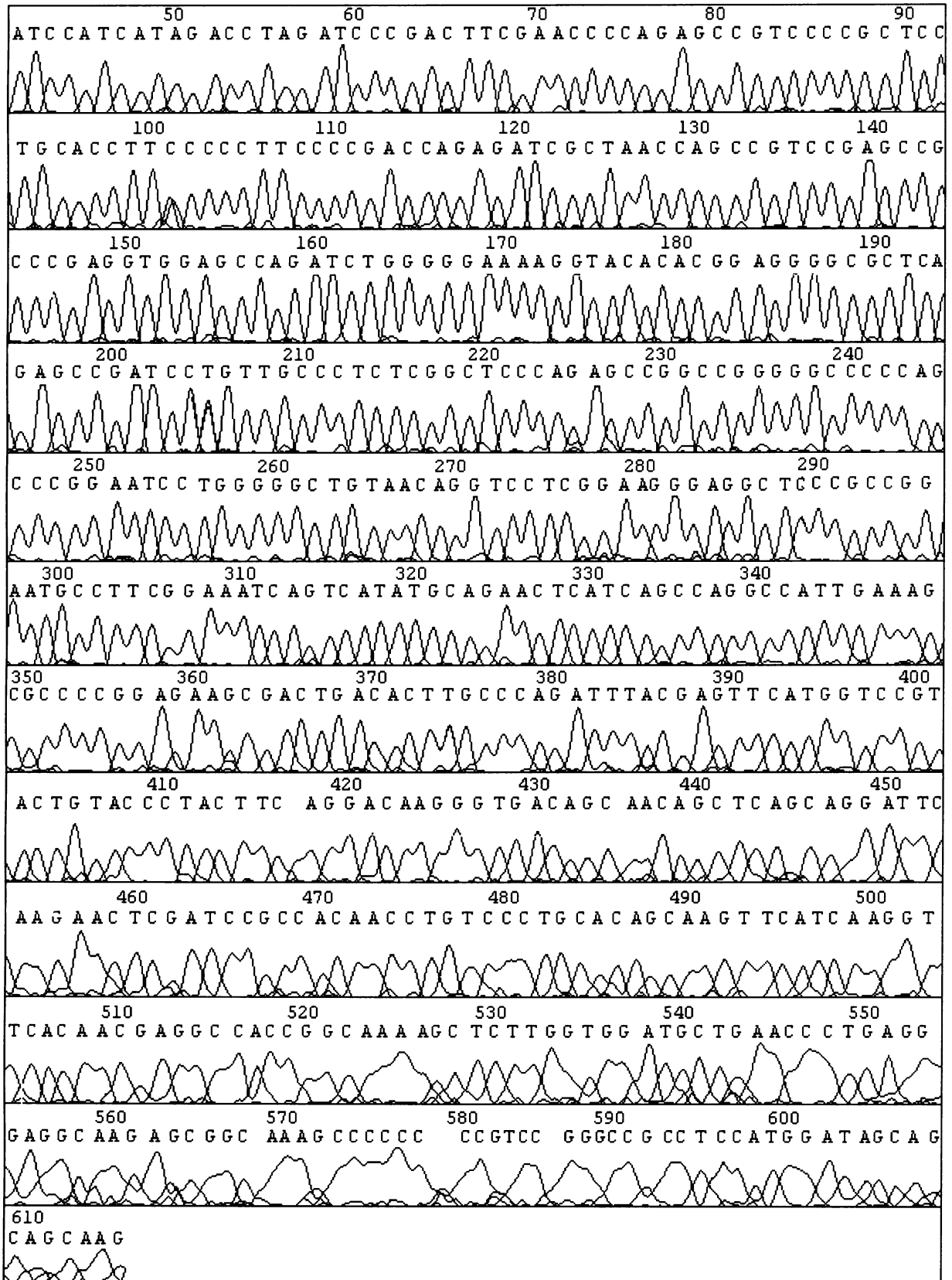
#### pET-15b sequence landmarks

T7 promoter	453-469
T7 transcription start	452
His•Tag coding sequence	362-380
Multiple cloning sites ( <i>Nde</i> I - <i>Bam</i> H I)	319-335
T7 terminator	213-259
<i>lac</i> I coding sequence	(866-1945)
pBR322 origin	3882
<i>bla</i> coding sequence	4643-5500



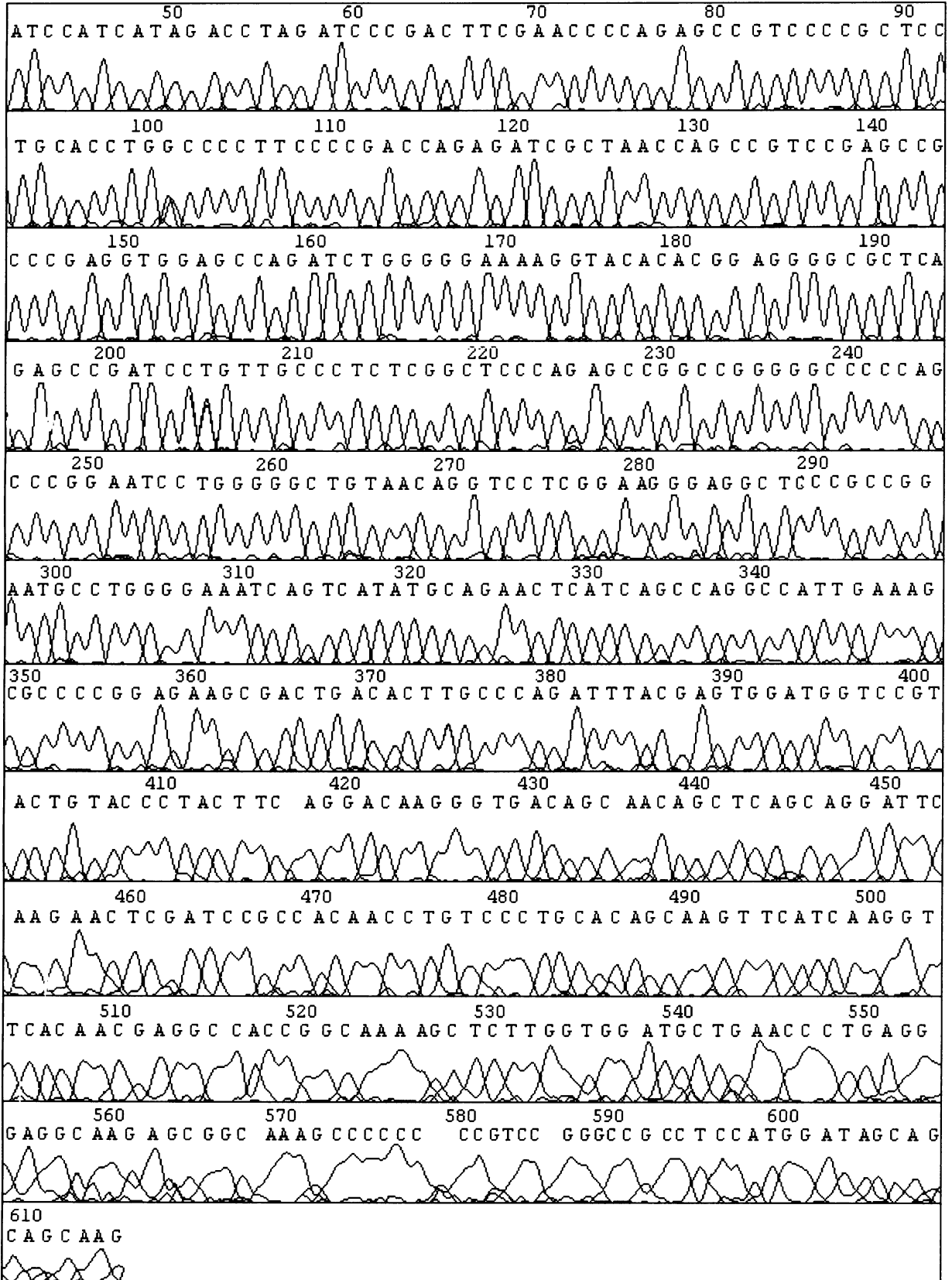
## Příloha 5

### Sekvenační záznam DNA kódující mutantní protein FoxO4<sub>11-213</sub> fin W



## Příloha 6

### Sekvenční záznam úseku plazmidové DNA proteinu FoxO4<sub>11-213</sub>



„Svoluji k zapůjčení této práce zejména pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.“

Jméno a příjmení	Datum vypůjčení	Průkaz totožnosti č. (OP, CP, ŘP)	Podpis