

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

**Katedra fyzikální a makromolekulární chemie**

---



STUDIUM INTERAKCÍ NÍZKOMOLEKULÁRNÍCH LÁTEK  
S DNA-VAZEBNOU DOMÉNOU FORKHEAD  
TRANSKRIPČNÍHO FAKTORU FOXO3

Study of interactions between low-molecular mass compounds and  
the DNA-binding domain of forkhead transcription factor FOXO3

Bakalářská práce  
studijního oboru Chemie

Praha 2018

Klára Kohoutová

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele prof. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Jsem si vědoma toho, že využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity. Dále prohlašuji, že tato práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze dne 24. 5. 2018

---

## Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli prof. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. a své konzultantce RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D. za odborné vedení při práci na mém bakalářském projektu.

Děkuji RNDr. Miroslavě Alblové, Ph.D. za pomoc při práci v laboratoři a RNDr. Kataríně Pšenákové za měření NMR experimentů a následné zpracování dat.

Dále bych ráda poděkovala Mgr. Mateji Horváthovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky k textu bakalářské práce.

Děkuji celému kolektivu Laboratoře biofyzikální chemie a Oddělení proteinových struktur Fyziologického ústavu AV ČR v.v.i. za vytvoření přátelského prostředí.

Dále děkuji oběma kolektivům oddělení pediatrie, Department of Pediatrics I a Department of Pediatrics II, Medizinische Universität Innsbruck, Austria, za spolupráci na projektu.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a blízkým za poskytnutí zázemí a podporu po celou dobu studia.

## Abstrakt

Tato bakalářská práce je součástí projektu, jehož cílem je vývoj a studium nízkomolekulárních látek, schopných inhibovat interakci lidského transkripčního faktoru FOXO3 s DNA, obsahující specifický motiv rozpoznávaný DNA-vazebnou doménou FOXO3. FOXO3 je jedním ze čtyř zástupců FOXO třídy forkhead transkripčních faktorů, evolučně konzervovaných proteinů účastnících se mnoha významných buněčných dějů. Mezi tyto se řadí regulace buněčného cyklu, odpověď na oxidativní stres, kontrola buněčného metabolismu a apoptóza. FOXO3 hraje významnou roli v procesu kancerogeneze, kde může vystupovat jednak jako tumorový supresor, ale zároveň může svou funkcí přispívat ke zvýšení odolnosti některých nádorových buněk vůči chemoterapii. Vzhledem k biologické funkci transkripčního faktoru FOXO3 má studium jeho nízkomolekulárních inhibitorů velký význam. V této práci byla studována sloučenina S9 oxalát jako potenciální inhibitor FOXO3-DNA vazebné interakce.

Cílem této bakalářské práce byla (I) příprava jak neznačené, tak  $^{15}\text{N}$  značené DNA-vazebné domény (DBD) proteinu FOXO3, (II) studium interakcí mezi FOXO3 DBD a nízkomolekulárním inhibitorem S9 oxalát pomocí NMR a analýzy elektroforetické mobility, EMSA a (III) predikce vazebné konformace a interakcí mezi FOXO3 DBD a nízkomolekulárním inhibitorem pomocí metod molekulového dokování.

Výsledky experimentů ukázaly, že sloučenina S9 oxalát přímo interaguje s DNA-vazebnou doménou FOXO3 a je schopna inhibovat její vazbu na DNA obsahující specificky rozpoznávaný motiv. Dále bylo identifikováno vazebné místo pro sloučeninu S9 oxalát a nejpravděpodobnější vazebná konformace.

## Abstract

This bachelor thesis is part of a project focused on studying low-molecular mass compounds able to inhibit the interaction between DNA-binding domain of human forkhead transcription factor FOXO3 and the target DNA. FOXO3 is one of four members of FOXO class transcription factors which belong to forkhead family of transcription factors. Forkhead transcription factors are evolutionary conserved proteins playing important roles in numerous cellular processes. These include cell-cycle regulation, oxidative stress response, control of cellular metabolism and apoptosis. FOXO3 plays an important role in cancer cells where it acts not only as a tumor suppressor but also can enhance their resistance to chemotherapy. Considering its biological functions, the study of small-molecule inhibitors of FOXO3 transcription factor is of particular importance. This bachelor thesis was focused on compound S9 oxalate as a potential inhibitor of FOXO3-DNA interaction.

Main goals of this thesis were: (I) preparation of both unlabeled and  $^{15}\text{N}$  labeled DNA-binding domain of FOXO3 transcription factor, (II) characterization of interactions between FOXO3 DBD and compound S9 oxalate using NMR and electrophoretic mobility shift analysis (EMSA), and (III) prediction of binding conformation and interactions between FOXO3 DBD and S9 oxalate using molecular docking.

Results revealed that S9 oxalate directly interacts with FOXO3 DBD residues responsible for DNA binding and therefore is able to inhibit FOXO3 binding to the target DNA. In addition, molecular docking simulations of S9 oxalate into the identified binding site suggested possible interactions between FOXO3 DBD and the compound.

# Obsah

Seznam použitých zkratk.....	8
1 Úvod.....	10
2 Literární přehled.....	11
2.1 Transkripce.....	11
2.1.1 Regulace transkripce a transkripční faktory.....	13
2.2 FOX rodina transkripčních faktorů a třída FOXO.....	14
2.3 Regulace a funkce FOXO transkripčních faktorů.....	15
2.3.1 Regulace funkce FOXO3 prostřednictvím fosforylace.....	15
2.3.2 Regulace funkce FOXO3 prostřednictvím acetylace.....	16
2.3.3 Regulace funkce FOXO3 prostřednictvím ubiquitinace.....	17
2.4 Struktura DNA-vazebné domény FOXO transkripčních faktorů.....	18
2.4.1 Struktura DNA-vazebné domény FOXO3.....	19
2.5 Interakce FOXO proteinů s DNA.....	19
2.5.1 Interakce DNA-vazebné domény FOXO3 s DNA.....	20
2.6 Inhibice vazby FOX DNA-vazebné domény a DNA.....	21
2.6.1 Inhibitory vazby FOXO3 DBD s DNA a jejich význam.....	22
3 Cíle práce.....	23
4 Materiály a metody.....	24
4.2 Použitý materiál.....	24
4.2.1 Seznam chemikálií.....	24
4.2.2 Použité přístroje.....	26
4.2.3 Ostatní pomůcky.....	27
4.3 Použité metody.....	28
4.3.1 Exprese a purifikace FOXO3 <sub>156-269</sub> .....	28
4.3.2 SDS-PAGE.....	34
4.3.3 Stanovení koncentrace proteinu FOXO3 <sub>156-269</sub> a výtěžku purifikace.....	37
4.3.4 Purifikace <sup>15</sup> N značeného proteinu FOXO3 <sub>156-269</sub> .....	38
4.3.5 Sloučenina S9 oxalát a odhad její koncentrace.....	40
4.3.6 Příprava dvouvláknové DNA z oligonukleotidů.....	42
4.3.7 EMSA.....	42
4.3.8 Nukleární magnetická rezonance.....	45
4.3.9 Molekulové dokování.....	50
5 Výsledky.....	53
5.1 Exprese a purifikace neznačeného proteinu FOXO3 <sub>156-269</sub> .....	53
5.1.1 Exprese a purifikace neznačeného proteinu FOXO3 <sub>156-269</sub> s vynecháním kationtově- výměnné chromatografie.....	53

5.1.2 Stanovení koncentrace neznačeného proteinu FOXO3 <sub>156-269</sub> a výtěžek purifikace .....	57
5.1.3 Purifikace neznačeného proteinu FOXO3 <sub>156-269</sub> s krokem kationtově-výměnné chromatografie .....	57
5.2 Expres a purifikace <sup>15</sup> N značeného proteinu FOXO3 <sub>156-269</sub> .....	59
5.2.1 Expres <sup>15</sup> N značeného FOXO3 <sub>156-269</sub> .....	59
5.2.2 Purifikace <sup>15</sup> N značeného FOXO3 <sub>156-269</sub> .....	60
5.2.3 Stanovení koncentrace <sup>15</sup> N značeného proteinu FOXO3 <sub>156-269</sub> a výtěžek purifikace ....	63
5.3 Odhad koncentrace nasyceného roztoku sloučeniny S9 oxalát v pufru pro NMR měření...	63
5.4 EMSA.....	64
5.4.1 Ověření inhibičního efektu S9 oxalátu na vazbu FOXO3 s DNA pomocí EMSA.....	65
5.4.2 Porovnání inhibičního efektu S9 oxalátu a samotného oxalátu na vazbu FOXO3 a DNA – kontrolní experiment .....	66
5.5 NMR experimenty.....	68
5.5.1 2D <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N HSQC experiment .....	68
5.5.2 STD experiment .....	71
5.6 Molekulové dokování.....	72
6 Diskuze.....	77
7 Závěr .....	79
8 Seznam citované literatury .....	80

# Seznam použitých zkratek

A .....	adenin
APS .....	peroxodisíran amonný
Arg .....	arginin
C .....	cytosin
CBB G-250 .....	Coomassie Brilliant Blue G-250
CDK-1 .....	cyklin-dependentní proteinkinasa 1
CSP .....	perturbance chemického posunu
DBD .....	DNA-vazebná doména (z angl. DNA-binding domain)
DMSO .....	dimethylsulfoxid
DNA .....	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
DNA-IRE .....	DNA obsahující IRE motiv nukleotidů
DTT .....	1,4-dithiothreitol
<i>E. coli</i> .....	<i>Escherichia coli</i>
EDTA .....	kyselina ethylendiamintetraoctová
EMSA .....	analýza elektroforetické mobility (z angl. electrophoretic mobility shift assay).
G .....	guanin
GST .....	glutathion S-transferasová kotva
H .....	histidin
His .....	histidin
HSQC .....	heteronukleární jedno-kvantová koherence (z angl. heteronuclear single quantum coherence)
I .....	isoleucin
IPTG .....	isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid
IRE .....	insulin responsivní element
LB médium .....	Luria-Bertani médium
Lys .....	lysin
L .....	leucin
M .....	methionin
N .....	asparagin



NMR .....	nukleární magnetická rezonance
NOE .....	nukleární Overhauserův efekt
PBS .....	fosfátový pufr (z angl. phosphate-buffered saline)
PI3K .....	fosfatidylinositol-3-kinasa (z angl. phosphatidylinositol-3-kinase)
PKB .....	proteinkinasa B
PPA2 .....	proteinfosfataza 2A
PMSF .....	fenylmethylsulfonyl fluorid
R .....	arginin
RNA .....	ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
rpm .....	otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
S .....	serin
Ser .....	serin
SDS-PAGE .....	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (z angl. sodiumdodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis)
SGK .....	sérum a glukokortikoid-regulovaná proteinkinasa
STD .....	rozdíl přenesené saturace (z angl. saturation transfer difference)
T .....	thymin
Thr .....	threonin
Trp .....	tryptofan
TBE .....	Tris/borát/EDTA
TCEP .....	tris(2-karboxyethyl)fosfin
TEMED .....	tetramethylethylenediamin
TRIS .....	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRIS-HCl .....	TRIS hydrochlorid
W .....	tryptofan

# 1 Úvod

Transkripční faktor FOXO3 patří do FOXO třídy transkripčních faktorů (Burgering, 2008). Transkripční faktory jsou proteiny, které regulují proces genové exprese na úrovni transkripce. Rozpoznávají určité sekvence DNA, na něž se váží, působí strukturální změny a ovlivňují tak funkci eukaryotní RNA polymerasy II, enzymového komplexu katalyzujícího biosyntézu RNA, která pro svou činnost vyžaduje přítomnost transkripčních faktorů (Phillips a Hoopes, 2008).

FOXO transkripční faktory patří do forkhead rodiny transkripčních faktorů. Tyto transkripční faktory byly poprvé objeveny u modelového organismu *Drosophila melanogaster*, kde jsou exprimovány v terminálních strukturách embrya a jsou zodpovědné za jejich správný vývoj. Mutace těchto transkripčních faktorů se projevuje charakteristickým tvarem hlavy, připomínajícím vidličku (angl. fork), odtud pojmenování forkhead transkripční faktory (Weigel *et al.*, 1989). Forkhead rodina transkripčních faktorů sestává z více než 100 zástupců rozdělených do tříd, značených písmeny A-R (Obšil a Obšilová, 2011). Forkhead transkripční faktory jsou evolučně konzervovány a ve své sekvenci obsahují DNA-vazebný motiv, tzv. forkhead doménu, zkráceně FOX. FOX DNA-vazebný motiv představuje variantu helix-smyčka-helix vazebného motivu tvořeného třemi  $\alpha$  helixy a dvěma smyčkami (Burgering, 2008).

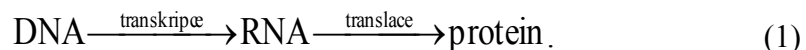
FOXO třída transkripčních faktorů má 4 členy: FOXO1, FOXO3, FOXO4 a FOXO6, jejichž DNA-vazebné domény rozpoznávají vazebný motiv nukleotidů 5'-(A/C)AA(C/T)A-3'. FOXO transkripční faktory hrají významnou roli v široké škále buněčných procesů, jako je například apoptóza, buněčný metabolismus, buněčná proliferace, diferenciací, odpověď na oxidativní stres a stárnutí (Burgering, 2008).

FOXO3 transkripční faktor prostřednictvím regulace exprese cílových genů působí jako tumorový supresor. U buněk získaných z biopsií neuroblastomu se však ukázalo, že zvýšený obsah FOXO3 proteinu v jádře a fosforylace Thr32 koreluje se IV. stadiem tohoto druhu rakoviny. Zde FOXO3 působí jako regulátor homeostázy a podporuje růst nádorových buněk, nádorovou angiogenezi a odolnost nádorových buněk vůči chemoterapii (Hagenbuchner *et al.*, 2016).

## 2 Literární přehled

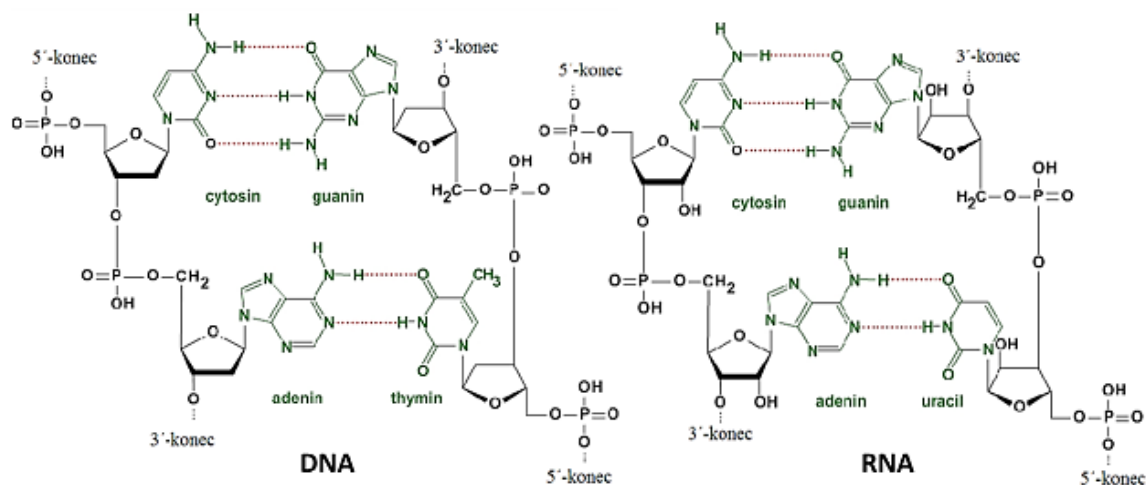
### 2.1 Transkripce

Transkripce je prvním krokem genové exprese. Při procesu genové exprese je genetická informace uložená v DNA prostřednictvím RNA převedena do struktury proteinu. Celý proces genové exprese vystihuje schéma:



Během transkripce dochází k přepisu genetické informace uložené v primární struktuře DNA do jednovláknové molekuly RNA, tzv. primární transkript. Primární transkript dále podléhá řadě posttranskripčních modifikací, výsledným produktem je jednovláknová molekula mediátorové RNA, mRNA. mRNA následně slouží jako předloha pro syntézu bílkovin na ribosomech (Nelson a Cox, 2008).

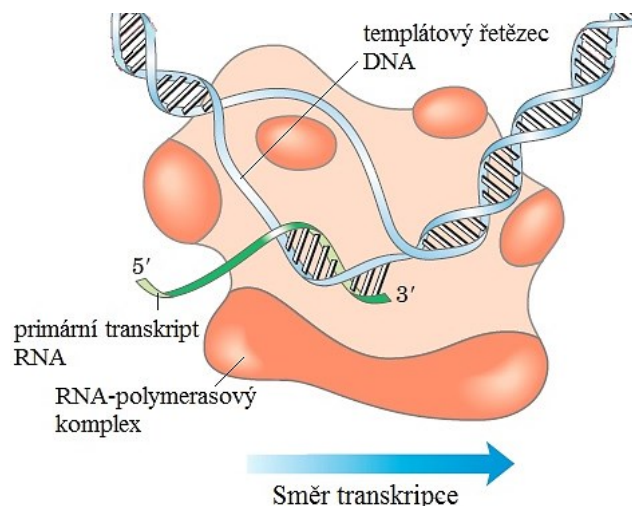
DNA a RNA jsou tzv. nukleové kyseliny, biopolymery, jejichž základními stavebními jednotkami jsou nukleotidy skládající se z dusíkaté báze, cukerné složky (pentosy) a esterově vázané kyseliny fosforečné. RNA se od DNA liší přítomností OH skupiny na 2' pozici aldopentosy a přítomností dusíkaté báze uracilu namísto thyminu (viz obr. 2.1). Na rozdíl od molekuly DNA, která je dvouvláknová, je většina molekul RNA jednovláknových. DNA se u eukaryotních organismů nachází v jádře buněk, kde je společně s bazickými bílkoviny součástí chromatinu. Eukaryotická transkripce je biologický proces, který se odehrává v jádře buněk (Nelson a Cox, 2008).



Obr. 2.1 Struktura nukleových kyselin. Nalevo je vyobrazena struktura nukleotidů DNA, napravo pak struktura nukleotidů RNA. Obrázek vystihuje princip komplementarity bází (vyznačeny zeleně), vodíkové můstky mezi bázemi jsou vyznačeny červenou přerušovanou čarou. Obrázek byl převzat a upraven dne 16. 4. 2018 z <http://www.studiumbiochemie.cz/na.html>.

Transkripce je katalyzována enzymem RNA polymerasou, proteinovým komplexem, který syntetizuje řetězec RNA na základě komplementarity párů bází. Eukaryotický genom kóduje 5 izoform RNA polymerasy, z nichž každá je zodpovědná za přepis jiné funkční skupiny RNA. Za přepis strukturálních genů, sekvencí DNA, které kódují proteiny, je zodpovědná RNA polymerasa II. Eukaryotní RNA polymerasy pro svou katalytickou činnost vyžadují přítomnost dalších proteinů, tzv. transkripčních faktorů.

Proces transkripce se skládá ze tří kroků: iniciace, elongace a terminace. Jedno vlákno DNA (kodogenní) se stává templátem pro syntézu vlákna RNA (tzv. primární transkript). Během iniciace dochází k nasednutí transkripčních faktorů a RNA polymerasy na promotor, 100-1000 párů bází dlouhou sekvenci DNA nacházející se blízko počátku transkripce, lokálnímu rozpletení dvoušroubovice DNA rušením vodíkových vazeb mezi komplementárními bázemi a umístění templátového řetězce DNA do aktivního centra RNA polymerasy. V tomto stavu je RNA polymerasa schopna iniciovat syntézu řetězce RNA, a tím nastává fáze elongace. Během elongace se RNA polymerasa posunuje po templátovém řetězci DNA ve směru  $3' \rightarrow 5'$  a syntetizuje řetězec RNA ve směru  $5' \rightarrow 3'$ , neboť je schopna připojovat příslušné nukleosidtrifosfáty, a tím katalyzovat vznik fosfodiesterové vazby, pouze na  $3'$ volný konec narůstajícího řetězce (viz obr. 2.2). Během poslední fáze transkripce, terminace, kdy RNA polymerasa doputuje k terminační sekvenci, dochází k její disociaci z templátového vlákna DNA a uvolnění primárního transkriptu RNA, který dále podléhá řadě úprav. Transkripce představuje pro buňku energeticky náročný proces, který vyžaduje regulaci (Nelson a Cox, 2008).



Obr. 2.2 Znárodnění elongační fáze transkripce. Enzym RNA polymerasa, proteinový komplex, katalyzuje vznik fosfodiesterové vazby a syntetizuje řetězec RNA ve směru  $5' \rightarrow 3'$ . Převzato a upraveno z (Nelson a Cox, 2008).

## 2.1.1 Regulace transkripce a transkripční faktory

Eukaryotní organismy vděčí za svou variabilitu sofistikovanému mechanismu regulace genové exprese, kdy pouze část genetické informace je převedena do formy proteinů. Eukaryotní regulace genové exprese probíhá na několika úrovních, mimo jiné i na úrovni transkripce. Regulace transkripce je zprostředkována transkripčními faktory, specifickými proteiny, které se váží na regulační sekvence DNA a ovlivňují proces transkripce cílových genů pozitivně i negativně. Tímto způsobem transkripční faktory rozhodují o tom, zda je exprese cílových genů "zapnuta" či "vypnuta" (Phillips a Hoopes, 2008).

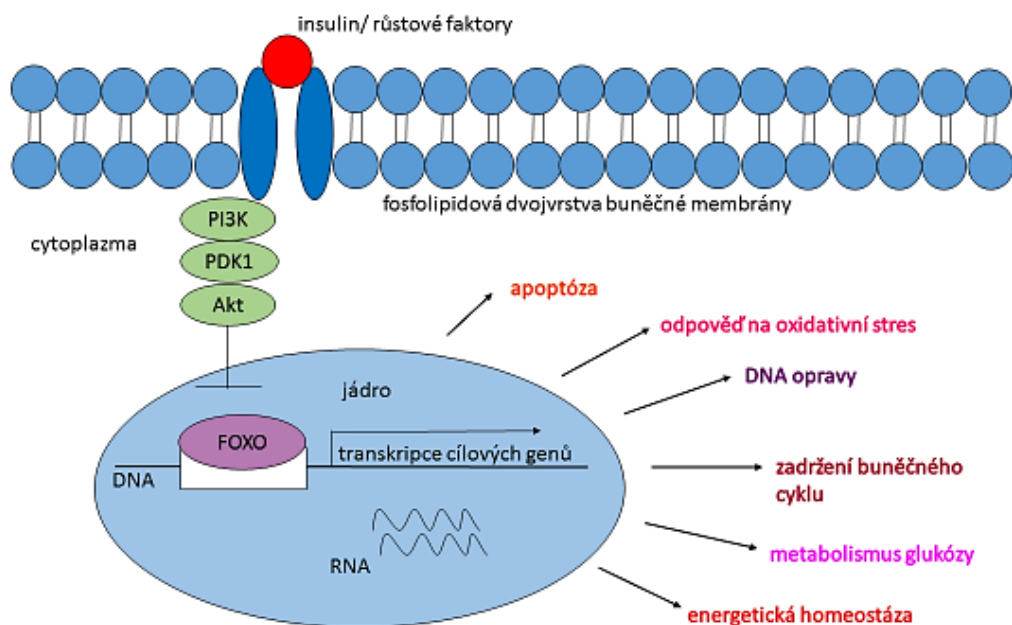
DNA regulační sekvence mají zpravidla 6-10 párů bází a jsou rozpoznávány transkripčními faktory, které navzájem interagují a ovlivňují funkci RNA polymerasy II. Většina eukaryotních genů obsahuje sekvenci zvanou promotor skládající se z tzv. TATA boxu a několika regulačních sekvencí rozpoznávaných transkripčními faktory. Vazba transkripčních faktorů na tyto sekvence indukuje vazbu RNA polymerasy II na promotor a iniciaci transkripce (Phillips a Hoopes, 2008).

Vazba transkripčních faktorů na regulační sekvence, a tedy i jejich regulační funkce, je zprostředkována jejich evolučně konzervovanými DNA-vazebnými doménami, které si zachovávají i určitý konformační motiv. Mezi nejčastější konformační motivy patří homeodoména, tvořena třemi spojenými  $\alpha$  helixy, zinkový prst ( $\alpha$  helix a  $\beta$ -skládaný list spojené iontem  $Zn^{2+}$ ), leucinový zip tvořený dvěma  $\alpha$  helixy, které se na DNA váží jako dimer, okřídlený (winged) helix a helix-smyčka-helix motiv DNA-vazebné domény (Phillips a Hoopes, 2008).

## 2.2 FOX rodina transkripčních faktorů a třída FOXO

FOXO proteiny patří do jedné ze tříd forkhead rodiny transkripčních faktorů. Pro forkhead rodinu transkripčních faktorů je charakteristická přítomnost tzv. Forkhead box, zkr. FOX DNA-vazebné domény, která je do velké míry sekvenčně konzervována ve všech třídách forkhead rodiny transkripčních faktorů. Pojmenování forkhead souvisí se členem této rodiny, dnes klasifikovaným jako FOXA, jehož gen byl identifikován v organismu *Drosophila melanogaster* a jeho mutace vedla k charakteristickému tvaru hlavy připomínající vidličku (angl. fork). Lidské forkhead transkripční faktory zahrnují přes 100 různých proteinů rozdělených do tříd od FOXA po FOXR na základě podobnosti jejich aminokyselinové sekvence (Carter a Brunet, 2007).

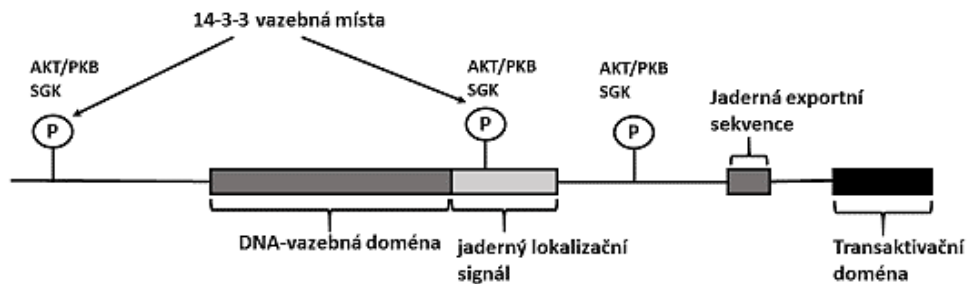
Transkripční faktory třídy O, FOXO transkripční faktory, byly poprvé objeveny v lidských nádorových buňkách (Galili *et al.*, 1993). Savčí FOXO transkripční faktory mají 4 zástupce, a to FOXO1, FOXO3, FOXO4 a FOXO6. FOXO1 a FOXO3 jsou exprimovány téměř ve všech tkáních. FOXO4 je exprimován především ve svalové tkáni a ledvinách, FOXO6 je exprimován primárně v mozku a játrech (Wang, Zhou a Graves, 2014). Funkce všech zástupců FOXO proteinů podléhá regulaci prostřednictvím insulin/PI3K/Akt signální dráhy. FOXO transkripční faktory hrají významnou roli v široké škále buněčných procesů, jako je například apoptóza, buněčný metabolismus, buněčná proliferace, diferenciace, DNA opravné mechanismy, regulace buněčného cyklu, odpověď na oxidativní stres a stárnutí (Burgering, 2008).



Obr. 2.3 Shrnutí funkce FOXO proteinů. Obrázek byl převzat a upraven z (Carter a Brunet, 2007).

## 2.3 Regulace a funkce FOXO transkripčních faktorů

Primární struktura FOXO1, FOXO3 a FOXO6 proteinů je tvořena sekvencí cca 650 aminokyselin, FOXO4 obsahuje kolem 500 aminokyselin. Molekuly FOXO proteinů jsou tvořeny čtyřmi doménami: DNA-vazebnou doménou, jaderným lokalizačním signálem, jadernou exportní sekvencí a transaktivační doménou na C-konci (Obšil a Obšilová, 2008).



Obr. 2.4 Schematické znázornění domén FOXO proteinů. Převzato a upraveno z (Obšil a Obšilová, 2008).

Aktivita FOXO proteinů je regulována prostřednictvím série posttranslačních modifikací, které působí jak aktivačně, tak inhibičně. Patří mezi ně například fosforylace, acetylace a ubiquitinace. Aktivní FOXO proteiny se nachází v jádře, kde se účastní exprese cílových genů (viz obr. 2.3, str. 14). Posttranslační modifikace ovlivňují buněčnou lokalizaci FOXO proteinů a jejich DNA-vazebnou afinitu. Přítomnost jaderného lokalizačního signálu je předpokladem pro import do jádra, kdežto přítomnost jaderné exportní sekvence je předpokladem pro jeho lokalizaci v cytosolu. FOXO proteiny obsahují obě tyto domény (viz obr. 2.4), orientace FOXO proteinů v jádře a mimo jádro je modulována fosforylací, zprostředkovanou kinasami, a interakcí s některými dalšími proteiny (Wang, Zhou a Graves, 2014). Dále bude uvedena především regulace funkce FOXO3 transkripčního faktoru.

### 2.3.1 Regulace funkce FOXO3 prostřednictvím fosforylace

Insulin/PI3K/Akt signální dráha je hlavním regulátorem aktivity FOXO proteinů (Carter a Brunet, 2007). Serin/threonin proteinkinasy PKB (proteinkinasa B), která bývá rovněž označována jako Akt, a SGK (sérum a glukokortikoid-regulovaná proteinkinasa) jsou důležitými komponentami této signální dráhy. Tyto dvě kinasy rozpoznávají aminokyselinový motiv RXXRXXS/T, kde R je arginin, S/T značí serin nebo threonin, který

je fosforylován, a X je symbolem pro libovolnou aminokyselinu (Xie, Chen a Yuan, 2012). Primární aminokyselinová sekvence FOXO3 proteinu obsahuje tři fosforylační místa pro Akt/PKB a SGK, jde o Thr32, Ser253 a Ser315. Akt přednostně fosforyluje Ser253, zatímco SGK primárně fosforyluje Ser315, Thr32 je stejně efektivně fosforylován oběma kinasami (Brunet *et al.*, 2001). Fosforylací dvou fosforylačních míst (viz obr. 2.4, str. 15), Thr32 a Ser253, vznikají dvě vazebná místa pro 14-3-3 protein, jehož navázání způsobí export FOXO3 proteinu z jádra a zároveň brání jeho opětovnému vstupu do jádra (Rena *et al.*, 2002).

FOXO3 je defosforylován, a tím aktivován, fosfatasou PPA2 (protein phosphatase 2A) (Liu *et al.*, 2012).

### **2.3.2 Regulace funkce FOXO3 prostřednictvím acetylace**

Podobně jako fosforylace, acetylace FOXO proteinů ovlivňuje jejich biologickou funkci. DNA-vazebná aktivita FOXO proteinů je indukována deacetylací a potlačena jejich acetylací (Wang, Zhou a Graves., 2014). Acetylované formy FOXO3 proteinu mají nižší DNA-vazebnou afinitu a jsou efektivněji fosforylovány prostřednictvím Akt. (Daitoku, Sakamaki a Fukamizu, 2011). Acetylace a deacetylace je zprostředkována acetyltransferasou resp. deacetylase. Acetylaci FOXO3 proteinu zprostředkovává enzym CBP neboli CREB vazebný protein (z angl. cAMP response element binding protein) popř. jemu příbuzný p300. Deacetylaci zprostředkovává enzym SIRT1 neboli Sirtuin 1 (Xie, Chen a Yuan, 2012).

Acetylováno je několik lysinových residuí v aminokyselinové sekvenci FOXO3 proteinu, z nichž tři se nachází v jejich DNA-vazebné doméně (Obšil a Obšilová, 2008). Jde o acetylaci Lys242 a Lys245. Lys245 přímo interaguje s DNA (viz oddíl 2.5.1, str. 20) (Daitoku, Sakamaki a Fukamizu, 2011). Více acetylované formy FOXO3 upřednostňují expresi proapoptotických genů, jako jsou Bim, TRAIL a FasL, kdežto méně acetylované formy upřednostňují expresi antioxidantů a cytoprotektivních genů (Wang, Zhou a Graves, 2014).

SIRT1 svou deacetylační funkcí hraje významnou roli v dlouhověkosti, zvyšuje odolnost vůči oxidativnímu stresu, inhibuje schopnost FOXO3 proteinu indukovat proces apoptózy, ale zároveň zvyšuje schopnost FOXO3 proteinu zastavit buněčný cyklus (Xie, Chen a Yuan, 2012).

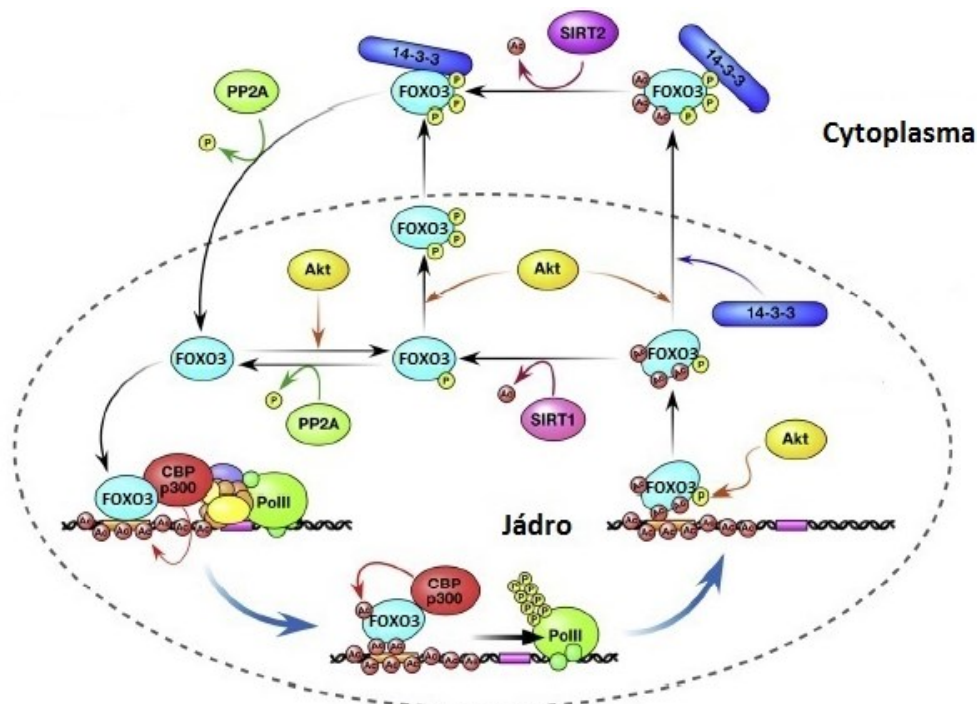


### 2.3.3 Regulace funkce FOXO3 prostřednictvím ubiquitinace

Ubiquitinace hraje rovněž důležitou roli při regulaci FOXO proteinů. FOXO proteiny podléhají jak monoubiquitinaci, tak polyubiquitinaci (Wang, Zhou a Graves, 2014).

Existuje několik ubiquitinových E3 ligas, které jsou nezbytné pro ubiquitinaci FOXO proteinů. E3 ligasa MDM2 (z angl. mouse double minute 2) se váže na FOXO3 a indukuje jeho degradaci na proteinových komplexech, proteasomech (Xie, Chen a Yuan, 2012).

Monoubiquitinace je indukována oxidativním stresem a má opačný účinek než polyubiquitinace, zvyšuje podíl FOXO3 proteinu lokalizovaných v jádře a jejich transkripční aktivitu (Xie, Chen a Yuan, 2012).

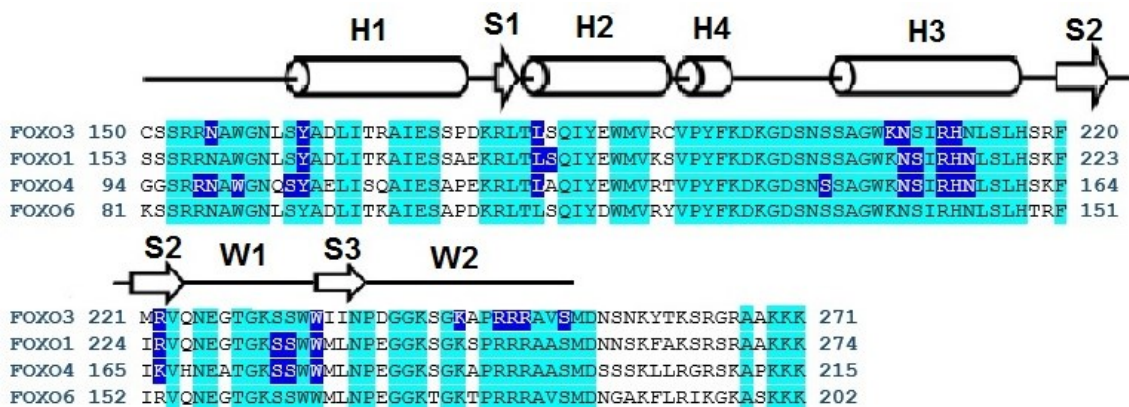


Obr. 2.5 Shrnutí regulace a funkce FOXO3 proteinu. Obrázek byl převzat a upraven z (Daitoku *et al.*, 2011). Biologická funkce FOXO3 proteinu je modulována prostřednictvím série posttranslačních modifikací. Fosforylace FOXO3 proteinu prostřednictvím Akt proteinkiny působí inhibičně, indukuje transport FOXO3 proteinu z jádra, čímž znemožňuje plnění jeho funkce coby transkripčního faktoru, defosforylace prostřednictvím PP2A působí naopak aktivačně. Vazba 14-3-3 proteinu na dvě vazebná místa, která vznikají fosforylací Thr32 a Ser253, způsobí transport FOXO3 proteinu do cytosolu. Acetylace FOXO3 proteinu prostřednictvím CBP acetyltransferasy působí inhibičně, více acetylované formy FOXO3 mají nižší DNA-vazebnou afinitu, deacetylace, zprostředkovaná SIRT1 deacetylase, působí aktivačně. Acetylované formy FOXO3 jsou efektivněji fosforylované Akt kinasou.

## 2.4 Struktura DNA-vazebné domény FOXO transkripčních faktorů

Primární a podobně i sekundární struktura DBD forkhead transkripčních faktorů si zachovává určitý motiv (viz obr. 2.6). DNA-vazebná doména je sekvencí cca 100 aminokyselin, někdy bývá označována jako "winged-helix" doména (z angl. wing – křídlo) podle svého charakteristického tvaru připomínajícího motýlí křídla. Sekundární struktura DNA-vazebné domény forkhead transkripčních faktorů je tvořena třemi  $\alpha$  helixy (H1, H2 a H3), třemi  $\beta$ -skládanými listy (S1, S2 a S3) a dvěma smyčkami (W1 a W2), angl. označovanými jako wings (z angl. wings – křídla), tvořícími tvar motýlích křídel. Uspořádání sekundárních struktur je (od N-konce) H1-S1-H2-H3-S2-W1-S3-W2 (viz obr. 2.6).

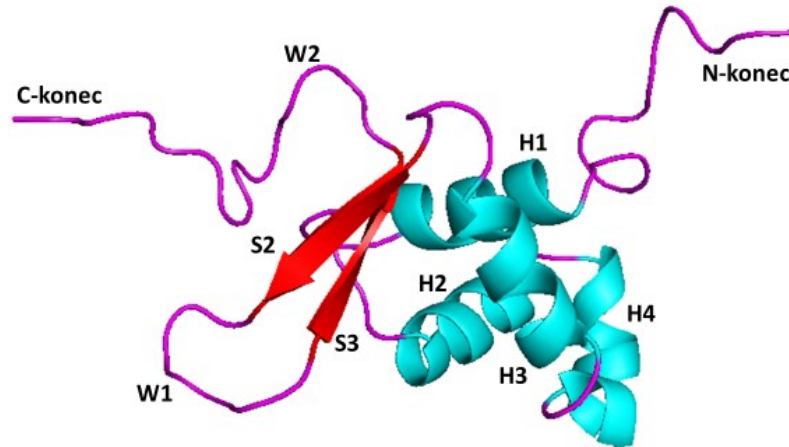
N-koncová část DNA-vazebné domény je tvořena klastrem tří  $\alpha$  helixů, H1, H2 a H3. Segment S1, vložený mezi  $\alpha$  helixy H1 a H2, interaguje se segmenty S2 a S3 a vytváří strukturu, kde jsou jednotlivé  $\beta$  struktury orientovány antiparalelně. Některé forkhead transkripční faktory obsahují ve své DNA-vazebné doméně navíc  $\alpha$  helix H4 mezi  $\alpha$  helixy H2 a H3 (viz obr. 2.6), případně  $\alpha$  helix H5 mezi  $\beta$  skládaným listem S3 a smyčkou W2 (Obšil a Obšilová, 2008).



Obr. 2.6 Sekvenční srovnání DNA-vazebných domén lidských FOXO transkripčních faktorů. Světle modře jsou vyznačeny aminokyseliny, které jsou konzervovány u všech zástupců FOXO proteinů, tmavě modře jsou zvýrazněny aminokyseliny účastníci se vazby DNA. Sekundární struktura je uvedena nad primární aminokyselinovou sekvencí, válce reprezentují  $\alpha$  helixy, šipky znázorňují oblasti s  $\beta$  strukturou. Obrázek byl převzat a upraven z (Obšil a Obšilová, 2008).

## 2.4.1 Struktura DNA-vazebné domény FOXO3

DNA-vazebná doména FOXO3 je tvořena čtyřmi  $\alpha$  helixy H1, H2, H3 a H4, dvěma  $\beta$  skládanými listy S2 a S3 a dvěma smyčkami W1 a W2 (viz obr. 2.7) (Wang *et al.*, 2008).



Obr. 2.7 NMR struktura FOXO3 DNA-vazebné domény. Obrázek byl vytvořen v programu The PyMol Molecular Graphics System, v.0.99, Schrödinger, LLC. Struktura byla převzata z (Wang *et al.*, 2008).

## 2.5 Interakce FOXO proteinů s DNA

DNA-vazebná doména forkhead transkripčních faktorů interaguje s DNA prostřednictvím specifických i nespecifických interakcí. Rezidua DNA-vazebné domény zprostředkující specifickou interakci s DNA jsou konzervována u všech forkhead transkripčních faktorů (viz obr. 2.6, str. 18) (Obšil a Obšilová, 2011).

FOXO transkripční faktory rozpoznávají dvě sekvence DNA, a to 5'-GTAAA(T/C)AA-3', tzv. DBE (z angl. Daf-16 family member-binding element), a 5'-(C/A)(A/C)AAA(C/T)AA-3', tzv. IRE (insulin responsivní element). Obě tyto DNA sekvence obsahují centrální motiv: 5'-(A/C)AA(C/T)A-3', rozpoznávaný DNA-vazebnými doménami všech forkhead transkripčních faktorů (Vacha *et al.*, 2013).

Při interakci s rozpoznávanou sekvencí DNA se  $\alpha$  helix H3 váže do velkého žlábků dvoušroubovice přibližně kolmo na její osu (viz obr. 2.8, str. 21) a je klíčový pro specifickou vazbu DNA. Další rezidua, která se podílí na vazbě dvoušroubovice DNA, se nachází v oblastech smyček W1 a W2,  $\alpha$  helixu H1 a  $\beta$  struktury S3 (viz obr. 2.8, str. 21).

Postranní řetězce reziduí  $\alpha$  helixu H3 interagují s molekulou DNA prostřednictvím přímých i molekulami vody zprostředkovaných vodíkových můstků a van der Waalových

interakcí, tj. dochází ke specifické interakci postranních řetězců aminokyselin s purinovými a pyrimidinovými bázemi molekuly DNA. Zároveň dochází i k nespecifické interakci postranních řetězců aminokyselin  $\alpha$  helixu H3 s fosfátovou kostrou molekuly DNA. Rezidua W1 a W2 smyčky FOXO transkripčních faktorů interagují pouze s fosfátovými skupinami cukr-fosfátové kostry DNA, pomáhají tedy stabilizovat komplex protein-DNA, ale nijak nepřispívají k vazebné specifitě (Obšil a Obšilová, 2011).

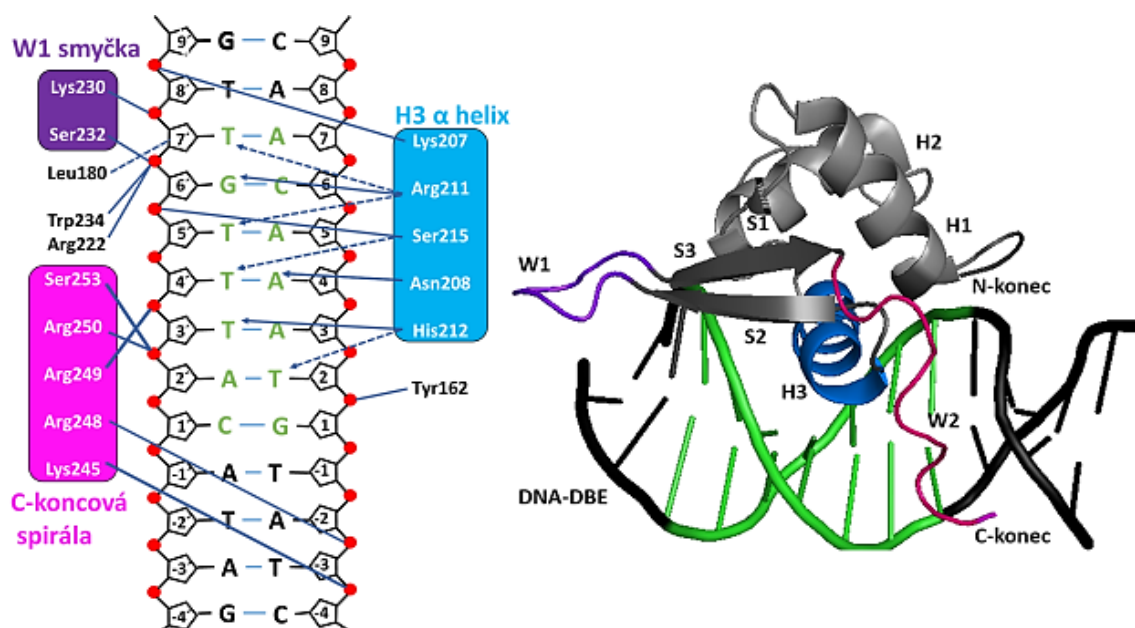
## 2.5.1 Interakce DNA-vazebné domény FOXO3 s DNA

FOXO3 DNA-vazebná doména při vazbě molekuly DNA prodělává řadu strukturních změn. V komplexu s dvoušroubovicí DNA je její struktura tvořena třemi  $\alpha$  helixy (H1, H2 a H3), třemi  $\beta$  skládanými listy (S1, S2 a S3) a jednou smyčkou (W1). Smyčka W2 mění konformaci na spirálu na C-konci (viz obr. 2.8, str. 21), oblast  $\alpha$  helixu H4 (viz obr. 2.8, str. 21) je v komplexu s molekulou DNA nestrukturovaná.

Helix H3 se váže na molekulu DNA v místě velkého žlábků téměř kolmo na její osu. Rezidua  $\alpha$  helixu H3, která jsou klíčová pro specifickou vazbu DNA, jsou Asn208, Ser215, Arg211, His212 (viz obr. 2.8, str. 21). Tato rezidua interagují s DNA specificky prostřednictvím vodíkových můstků a van der Waalsových interakcí, ale i nespecificky interakcí s fosfátovými skupinami cukr-fosfátové kostry DNA (Ser215, Lys207). Methylové skupiny thyminových bází interagují s postranními řetězci aminokyselin DNA-vazebné domény prostřednictvím van der Waalsových interakcí a jsou proto klíčové pro rozpoznání DNA proteinem FOXO3 (Tsai *et al.*, 2007).

C-konec DNA-vazebné domény FOXO3 zaujímá v komplexu s DNA strukturu spirály a interaguje s velkým žlábkem (viz obr. 2.8, str. 21). Bazická rezidua Arg248-Arg249-Arg250, jež jsou zachována i u ostatních FOXO proteinů, vytváří iontové páry s fosfátovými skupinami cukr-fosfátové kostry DNA ve velkém žlábkem. Ser253 interaguje s fosfátovou skupinou cukr-fosfátové kostry DNA, zároveň je fosforylačním místem pro PKB (viz oddíl 2.3.1, str. 15).

Postranní řetězce reziduí smyčky W1 se rovněž podílí na vazbě DNA interakcí s fosfátovými skupinami cukr-fosfátové kostry DNA (viz obr. 2.8, str. 21), mohou přispívat ke stabilizaci komplexu DNA-protein, ale přímo se nepodílí na specifickém rozpoznávání DNA (Tsai *et al.*, 2007).



Obr. 2.8 Znárodnění interakcí DBD FOXO3 s molekulou DNA obsahující DBE motiv Obrázek nalevo schematicky znázorňuje interakce DBD proteinu FOXO3 s DNA obsahující DBE motiv (vyznačen zeleně), specifické interakce jsou vyznačeny šipkami, plné čáry symbolizují vodíkové vazby, přerušované čáry van der Waalsovy interakce (Tsai et al., 2007). Napravo je krystalová struktura DBD proteinu FOXO3 v komplexu s molekulou DNA (sekvence na obrázku nalevo). Obrázek napravo byl vytvořen v programu The PyMol Molecular Graphics System, v.0.99, Schrödinger, LLC.

## 2.6 Inhibice vazby FOX DNA-vazebné domény a DNA

Biologický význam FOX proteinů podněcuje snahu o nalezení a charakterizaci vhodných inhibitorů, které mají klinický význam.

Inhibice je děj vedoucí ke zpomalení až úplnému zastavení chemické reakce a může probíhat jak reverzibilně, tak ireverzibilně. Inhibitor je látka, která i při nízké koncentraci zpomaluje nebo prakticky znemožňuje průběh chemické reakce (Vohlídal, 2001). Nízkomolekulární inhibitory vazby FOX DBD transkripčních faktorů a DNA interagují s DBD, destabilizují DNA-DBD komplex, a tím snižují aktivitu FOX proteinů, coby transkripčních faktorů. Vazebnou afinitu je zvykem vyjadřovat pomocí disociační konstanty,  $K_D$ .  $K_D$  pro specificky rozpoznávaný motiv DNA je řádově  $10^{-7}$ .  $K_D$  pro IRE vazebný motiv je o něco vyšší než pro DBE vazebný motiv (oba motivy nukleotidů viz str. 19). DNA-vazebná doména FOXO4 transkripčních faktorů váže sekvenci IRE s přibližně 4× nižší afinitou než sekvenci DBE (Vacha *et al.*, 2013). V důsledku toho byla DNA s IRE motivem vybrána pro EMSA experimenty v této práci. Potenciální inhibitor je takový, který se svou  $K_D$  vůči DBD blíží  $K_D$  pro vazbu DBD a DNA.

Předchozí studie ukázaly, že vhodné nízkomolekulární sloučeniny interagující s DNA-vazebnou doménou FOX transkripčních faktorů inhibují jejich funkci, a tím expresi cílových genů. Bylo publikováno několik nízkomolekulárních sloučenin ( $K_D$  pro vazbu s DBD řádově  $10^{-5}$ ) inhibujících činnost FOXM1 transkripčních faktorů *in vivo* (Gormally et al., 2014).

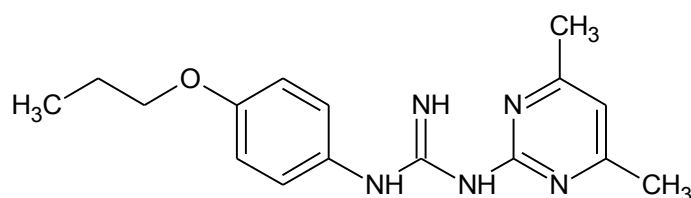
Inhibice vazby DBD FOX transkripčních faktorů může být sledována pomocí různých fyzikálně-chemických metod, mezi něž patří např. změna fluorescenční polarizace, analýza elektroforetické mobility, analýza elektroforetické mobility (EMSA), a nukleární magnetická rezonance.

### 2.6.1 Inhibitory vazby FOXO3 DBD s DNA a jejich význam

U buněk získaných z biopsií neuroblastomu, embryonálního maligního nádoru raného dětského věku, se ukázalo, že zvýšený obsah FOXO3 proteinu v jádře a fosforylace Thr32 koreluje s pokročilým, IV., stadiem tohoto druhu rakoviny. Vlivem hypoxického prostředí a DNA poškozujících látek, využívanými při chemoterapii, dochází ke zvyšování koncentrace FOXO3 proteinu v jádře a jeho aktivaci, a to i přes fosforylaci Thr32 (viz oddíl 2.3.1, str. 15). V jádře FOXO3 transkripční faktor působí jako regulátor homeostázy, podporuje růst nádorových buněk, nádorovou angiogenezi a odolnost nádorových buněk vůči chemoterapii (Hagenbuchner *et al.*, 2016).

Virtuálním prohledáváním knihovny 330 000 nízkomolekulárních látek bylo vybráno 130 potenciálních inhibitorů vazby FOXO3 DBD s DNA. Tyto byly podrobeny biologickým testům. Pět sloučenin prokazatelně inhibovalo proces FOXO3 indukované apoptózy *in vivo* (biologické testy byly provedeny na Medizinische Universität Innsbruck, Austria). Jednou z těchto sloučenin byla sloučenina S9,

N-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)-N'-(4-propoxyphenyl)guanidin.



Obr. 2.9 Struktura sloučeniny S9, N-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)-N'-(4-propoxyphenyl)guanidin. Obrázek byl nakreslen v programu ACD/ChemSketch, Freeware version, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, On, Canada, www.acdlabs.com, 2015.

### 3 Cíle práce

1. Exprese a purifikace neznačené a izotopem  $^{15}\text{N}$  značené DNA-vazebné domény proteinu FOXO3 (sekvence aminokyselin 156-269).
2. Ověření potenciálu nízkomolekulární sloučeniny S9 oxalát inhibovat vazbu DNA-vazebné domény proteinu FOXO3 s dvoušroubovicí DNA obsahující IRE motiv pomocí analýzy elektroforetické mobility (EMSA).
3. Studium interakcí mezi FOXO3 DBD a sloučeninou S9 oxalát pomocí metod NMR a molekulového dokování.

# 4 Materiály a metody

## 4.2 Použitý materiál

### 4.2.1 Seznam chemikálií

1,4-dithiothreitol.....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
<sup>15</sup> N značený chlorid amonný.....	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
ampicilin.....	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
azid sodný.....	PENTA (Česká republika)
Bradfordovo činidlo.....	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
bromfenolová modř.....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
CBB G-250.....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
d-biotin.....	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
D-glukóza.....	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
dihydrogenfosforečnan sodný (dihydrát).....	PENTA (Česká republika)
dimethylsulfoxid.....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
dodecylsírán sodný.....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
dusičnan stříbrný.....	PENTA (Česká republika)
EDTA.....	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
formaldehyd.....	PENTA (Česká republika)
glycerol.....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
guanidin hydrochlorid.....	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
hydrogenfosforečnan sodný (dodekahydrát).....	PENTA (Česká republika)
hydroxid sodný.....	PENTA (Česká republika)
chlorid draselný.....	PENTA (Česká republika)
chlorid hořečnatý (hexahydrát).....	LACH-NER, s.r.o. (Česká republika)
chlorid kobaltnatý (hexahydrát).....	PENTA (Česká republika)
chlorid manganatý (tetrahydrát).....	PENTA (Česká republika)
chlorid měďnatý (dihydrát).....	PENTA (Česká republika)
chlorid sodný.....	PENTA (Česká republika)
chlorid vápenatý.....	PENTA (Česká republika)



chlorid zinečnatý.....	PENTA (Česká republika)
chlorid železitý (hexahydrát).....	PENTA (Česká republika)
IPTG.....	EMD Biosciences, Inc. (Německo)
isopropanol.....	PENTA (Česká republika)
kalibrační pufr (pH = 4,01, 7,01).....	Hanna Instruments Czech s.r.o. (Česká republika)
kvasinkový extrakt.....	SERVA Electrophoresis GmbH (Německo)
kyselina boritá.....	PENTA (Česká republika)
kyselina citronová.....	PENTA (Česká republika)
kyselina octová.....	Lachema, s.r.o. (Česká republika)
kyselina dusičná.....	PENTA (Česká republika)
lysozym.....	SERVA Electrophoresis GmbH (Německo)
PMSF.....	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
PreScission proteasa.....	připravena RNDr. V. Obšilovou, Ph.D.
reduovaný glutathion.....	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
Rotiphorese gel.....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
síran hořečnatý (heptahydrát).....	PENTA (Česká republika)
síran sodný (dekahydrát).....	PENTA (Česká republika)
thiamin.....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
TCEP.....	Thermo Fisher Scientific, Inc. (USA)
těžká voda.....	Euriso-top GmbH (Německo)
thiosíran sodný (pentahydrát).....	LACH-NER, s.r.o. (Česká republika)
TRIS.....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)
trypton.....	Carl Roth GmbH & Co. Kg (Německo)

## 4.2.2 Použité přístroje

3505 pH Meter.....	Nova Capital Ltd. (Velká Británie)
ÄKTAprime.....	GE Healthcare (USA)
analytické váhy ABS 120-4.....	KERN & SOHN (Německo)
centrifuga 5804R.....	Eppendorf AG (Německo)
centrifuga Universal 4 x 100 Z323K.....	HERMLE Labortechnik GmbH (Německo)
centrifuga 5415D.....	Eppendorf AG (Německo)
centrifuga MiniSpin PL-109.....	Eppendorf AG (Německo)
850MHz NMR spektrometr Avance III.....	Bruker (USA)
peristaltická pumpa.....	IDEX Health & Science (Švýcarsko)
předvážky EG-420 NM.....	KERN & SOHN (Německo)
Shaking inkubátor NB-205.....	N-BIOTEK, Inc. (Korejská republika)
spektrofotometr IMPLEN P300.....	BioTech (USA)
spektrofotometr NanoDrop.....	Thermo Fisher Scientific, Inc. (USA)
spektrofotometr UV-1800 s Peltierovým termostatem S-1700.....	Shimadzu Corporation (Japonsko)
stroj na výrobu ledu.....	Brema Ice Makers (Itálie)
suchý ohřívač.....	Grant Instruments (Velká Británie)
vortex ZX3.....	VELP Scientifica (Itálie)
zdroj pro vertikální elektroforézu.....	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)

### 4.2.3 Ostatní pomůcky

aparatura pro vertikální elektroforézu.....	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)
automatické pipety.....	Eppendorf AG (Německo)
dialyzační membrána Spectra/Por.....	SERVA Electrophoresis GmbH (Německo)
<i>E.coli</i> BL21(DE3).....	Stratagene Corporation (USA)
filtry o velikosti pórů 0,45 µm.....	GE Healthcare (USA)
GST Sepharose® 4 Fast Flow.....	GE Healthcare (USA)
injekční stříkačky.....	B. Braun Melsungen AG (Německo)
kolona pro GST chromatografii.....	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)
kolona Mono S® 5/50 GL.....	GE Healthcare (USA)
kolona HiLoad™ 26/600.....	GE Healthcare (USA)
Superdex™ 75 pg	
koncentrátory VIVASPIN TURBO 15.....	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG (Německo)
křemenné kyvety.....	Agilent technologies, Inc. (USA)
svorky na dialyzační membrány.....	SERVA Electrophoresis GmbH (Německo)
plastové zkumavky.....	Thermo Fisher Scientific, Inc. (USA)
Shigemi kyvety.....	Shigemi, Inc (Japonsko)
SP sepharosa.....	GE Healthcare (USA)

## 4.3 Použité metody

### 4.3.1 Exprese a purifikace FOXO3<sub>156-269</sub>

#### 4.3.1.1 Exprese

DNA-vazebná doména FOXO3 proteinu (sekvence 156-269) byla exprimována jako fúzní protein s GST kotvou ( $M_r = 26$  kDa) na N-konci v buňkách *E. coli*, kmen BL21(DE3). Gen pro FOXO3<sub>156-269</sub> v plasmidu p-GEX-6P-1 byl získán od Assoc.Prof.PD.Dr. M. J. Ausserlechnera, Medizinische Universität Innsbruck.

Sterilně bylo založeno několik bakteriálních kultur. Do 3-8 5ml skleněných zkumavek obsahujících LB médium (Luria Bertani) (složení LB média viz tab. 4.1, str. 29) bylo pipetováno 5  $\mu$ l roztoku ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml. Plasmid p-GEX-6P-1 obsahuje gen pro rezistenci vůči ampicilinu, přidavek ampicilinu zajistí nárůst pouze buněčné kultury vybavené tímto plasmidem. Poté bylo do každé zkumavky pipetováno 5  $\mu$ l glycerolové konzervy, obsahující 700  $\mu$ l buněčné kultury a 300  $\mu$ l sterilního glycerolu. Zkumavky byly uzavřeny kovovými víčky a byly inkubovány přes noc při 180 rpm a teplotě 37 °C.

Buněčná kultura z každé zkumavky byla přenesena do 1l Erlenmeyerovy baňky obsahující 900 ml sterilního LB média a ampicilinu o koncentraci 100  $\mu$ g/ml. Baňky byly inkubovány za stálého třepání při 190 rpm a teplotě 37 °C. V 1hod intervalech byly odebrány vzorky a byla měřena jejich optická denzita, OD, při vlnové délce 600 nm. OD<sub>600</sub> je přímo úměrná množství buněk v suspenzi. Jako pozadí bylo použito čisté LB médium. Při dosažené hodnotě OD<sub>600</sub> = 0,5  $\text{cm}^{-1}$  byla teplota snížena na 20 °C. Exprese genu pro FOXO3<sub>156-269</sub>, a tím i proteosyntéza, byla indukována při OD<sub>600</sub> = 0,8  $\text{cm}^{-1}$  přidavkem 1 ml 0,5M IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid). Gen pro protein FOXO3<sub>156-269</sub> je v plasmidu p-GEX-6P-1 zaklonován v oblasti *lac* operonu. IPTG je látka strukturně podobná allolaktose, metabolitu laktosy, stejně tak jako laktosa se váže na *lac* represor, který je uvolněn z *lac* operátoru, což umožní transkripci genů *lac* operonu. Následovala inkubace při 20 °C při 190 rpm přes noc (12-15 hodin).

Druhý den byla buněčná kultura centrifugována při 3000 rpm a teplotě 4 °C po dobu 20 minut. Supernatant byl slit a peleta z 3 l LB média byla resuspendována při teplotě

4 °C ve 100 ml lyzačního pufru (složení viz tab. 4.2). Buněčná suspenze byla v 50ml plastových zkumavkách zamražena v - 80 °C.

*Tab. 4.1 Složení LB média, 1 l*

<u>Chemikálie</u>	<u>Odměřené množství</u>
trypton	10 g
NaCl	10 g
kvasinkový extrakt	5 g

*Tab. 4.2 Složení lyzačního pufru, 100 ml*

<u>Chemikálie</u>	<u>Odměřené množství</u>
10× PBS (složení viz tab. 4.3)	20 ml
1,4-dithiothreitol	0,154 g
0,5M roztok EDTA (pH = 8)	200 µl

*Tab. 4.3 Složení 10× koncentrovaného PBS pufru, 1l*

<u>Chemikálie</u>	<u>Odměřené množství</u>
NaCl	80 g
KCl	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g
NaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	14,4 g
NaN <sub>3</sub>	0,4 g

#### 4.3.1.2 Lyze buněk

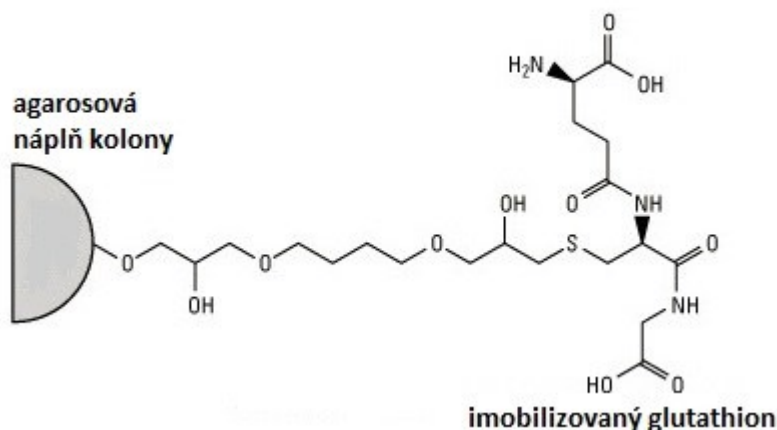
Buněčná suspenze byla rozmrazena a při 4 °C byla za stálého míchání inkubována s 10 mg lysozymu na buněčnou suspenzi z 3 l LB média. Lysozym je enzym schopný narušit buněčnou stěnu bakterií a pomoci tak uvolnění buněčného obsahu do okolního roztoku. Proces uvolnění proteinu FOXO3<sub>156-269</sub> z buněk *E. coli* do okolního roztoku byl dokončen sonikací, při které je za účelem rozrušení buněčné stěny na buněčnou suspenzi aplikována ultrazvuková vlna. Buněčná suspenze byla sonikována s celkovým časem trvání pulzu 16 minut a výkonem pulzu 55 W v cyklech 15 s ON (zapnutý pulz),

45 s OFF (vypnutý pulz). Před sonikací byl do suspenze přidán 1 ml PMSF (fenylmethylsulfonylfluorid), inhibitoru serinových proteas. Buněčná suspenze se vlivem ultrazvukového pulzu zahřívá, proto bylo nutné sonikaci provádět při teplotě 0 °C ve vodní lázni s ledem.

Po sonikaci byla buněčná suspenze rozlita do kyvet, které byly vyváženy, a byla centrifugována při 13500 rpm a teplotě 4 °C po dobu 45 minut. Supernatant, ve kterém byl přítomen purifikovaný protein, ale i řada dalších proteinů, byl uchován při teplotě 0 °C.

### 4.3.1.3 GST afinitní chromatografie

Glutathion-S-transferasová kotva (GST) na N-konci FOXO3<sub>156-269</sub> proteinu je afinitní kotvou o sekvenci 211 aminokyselin. Glutathion-S-transferasa je enzym, jehož specifickým substrátem je glutathion, tripeptid Glu-Cys-Gly. Je-li redukovaný glutathion imobilizován na stacionární fázi kolony (agarosa) prostřednictvím své sulfhydrylové skupiny, dochází k navázání proteinů s GST afinitní kotvou na koloně interakcí enzym-substrát. Následnou elucí vhodným elučním roztokem dojde k uvolnění proteinu s GST kotvou a jeho eluci. Za tímto účelem je možné použít roztok s nadbytkem redukovaného glutathionu (Frangioni a Neel, 1993).



Obr. 4.1 Agarosová náplň kolony pro GST afinitní chromatografii s imobilizovaným glutathionem. Obrázek byl převzat a upraven dne 16. 4. 2018 z <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/gst-tagged-proteins-production-purification.html>.

Na lyzát buněčné kultury pěstované ve 3 l LB média byla plastová kolona naplněna 5 ml Glutathion Sepharosy® 4 Fast Flow. Kolona byla pomocí peristaltické pumpy promyta 15 ml pufru pro GST chromatografii (složení viz tab. 4.4, str. 31). Buněčný lyzát

byl inkubován s glutathion sepharosou za stálého míchání při teplotě 4 °C po dobu 30 minut, aby došlo k navázání co největšího množství FOXO3-GST na povrchu stacionární fáze. Po nanesení glutathion sepharosy zpět na kolonu byla kolona pomocí peristaltické pumpy promyta 400 ml pufru pro GST chromatografii, aby došlo k vymytí veškerých látek, které se nezachytily na koloně. Eluce byla provedena gravitačně 60 ml elučního pufru (složení viz tab. 4.5) s nadbytkem redukovaného glutathionu. Frakce byly jímány do šesti 15ml plastových zkumavek. Během eluce byly odebírány vzorky pro reakci s Bradfordovým činidlem (2 + 2 µl), bylo tak orientačně stanoveno, ve kterých frakcích je eluován protein.

Kolona byla po GST afinitní chromatografii ihned regenerována promytím 20 ml 70% ethanolu, poté 25 ml 1× koncentrovaného PBS pufru (složení 10× koncentrovaného pufru viz tab. 4.3, str. 29), jehož pH bylo upraveno na 7,3, následně byla kolona promyta 10 ml filtrovaného 6M roztoku guanidin hydrochloridu (57 g guanidin hydrochloridu na 100 ml roztoku), poté byla opět promyta 25 ml 1× koncentrovaného PBS pufru a byla uchována v 20% ethanolu.

*Tab. 4.4 Složení pufru pro GST chromatografii, 500 ml*

<u>Chemikálie</u>	<u>Odměřené množství</u>
1M roztok Tris (pH = 7,5)	10 ml
NaCl	15 g
0,5M roztok EDTA	1 ml
1,4-dithiothreitol	0,78 g
glycerol	50 g

*Tab. 4.5 Složení elučního roztoku pro GST chromatografii, pH = 8*

<u>Chemikálie</u>	<u>Odměřené množství</u>
pufr pro GST chr. (viz tab. 4.4)	60 ml
glutathion	0,186 g

#### 4.3.1.4 Dialýza a odštěpení GST kotvy

Při dialýze dochází k difúzi látek z prostředí o vyšší koncentraci do prostředí s nižší koncentrací a průchodu některých molekul polopropustnou membránou. Polopropustná membrána umožňuje průchod molekul menších, než je velikost jejich pórů. Roztok proteinu byl vložen do polopropustné dialyzační membrány, mající v sobě póry o velikosti menší, než je velikost proteinu FOXO3<sub>156-269</sub>. Byla použita dialyzační membrána propouštějící molekuly do relativní molekulové hmotnosti 6-8 kDa. Roztok proteinu byl dialyzován v pufru pro dialýzu (složení viz tab. 4.6) za stálého míchání při teplotě 4 °C.

Pro další použití proteinu FOXO3<sub>156-269</sub> je přítomnost GST afinitní kotvy nežádoucí, a musí být proto odštěpena. Štěpení bylo provedeno přímo v průběhu dialýzy pomocí enzymu PreScission proteasy. PreScission proteasa je enzym, který specificky štěpí vazbu mezi glutaminem a glycinem v rozpoznávací sekvenci: Leu-Glu-Val-Phe-Gln-Gly-Pro. Pro kvantitativní odštěpení GST afinitní kotvy je potřeba použít 10 U PreScission proteasy na 1 mg proteinu. Výtěžek proteinu s GST afinitní kotvou, exprimovaného ve 3 l LB média, po GST afinitní chromatografii byl maximálně 90 mg. S roztokem proteinu bylo do dialyzační membrány pipetováno 300 µl PreScission proteasy ( $c = 3030$  U/ml) na roztok proteinu exprimovaného v buňkách *E. coli*, jejichž kolonie byly pěstovány ve 3 l LB média.

Dialýza do pufru pro dialýzu a současné štěpení probíhaly vždy minimálně po dobu 6 hodin. Po 6 hodinách dialýzy a současného štěpení byla dialyzační membrána obsahující protein FOXO3<sub>156-269</sub> a odštěpenou GST kotvu v pufru pro dialýzu přemístěna do pufru pro kationtově-výměnnou chromatografii (složení viz tab. 4.7, str. 33). pH pufru pro kationtově-výměnnou chromatografii bylo upraveno na 6,3.

Po dialýze byl roztok z dialyzační membrány centrifugován při 2800 rpm a teplotě 4 °C po dobu 5 minut a přefiltrován přes filtr o velikosti pórů 0,45 µm.

Tab. 4.6 Složení pufru pro dialýzu, 1 l

<u>Chemikálie</u>	<u>Odměřené množství</u>
1M roztok Tris (pH = 7,5)	20 ml
NaCl	5,8 g
0,5M roztok EDTA	2 ml
1,4-dithiothreitol	0,154 g
glycerol	100 g



Tab. 4.7 Složení pufru pro kationtově-výměnnou chromatografii, 1 l, pH = 6,3

<u>Chemikálie</u>	<u>Odměřené množství</u>
monohydrát kyseliny citronové	11,5 g
0,5M roztok EDTA (pH = 8)	2 ml
1,4-dithiothreitol	0,308 g

### 4.3.1.5 Kationtově-výměnná chromatografie

Kationtově-výměnná chromatografie je chromatografickou metodou, kde stacionární fázi představuje měnič iontů, katex, schopný výměny kladně nabitých iontů (Opekar *et al.*, 2010). Při chromatografii dochází k reverzibilní výměně kladně nabitých iontů navázaných na funkční skupiny stacionární fáze za kladně nabité molekuly proteinu. Kladný náboj proteinu FOXO3<sub>156-269</sub> je zabezpečen hodnotou pH pufru pro kationtově-výměnnou chromatografii (pH = 6,3), složení viz tab. 4.7, která je nižší než teoretická hodnota pI proteinu. Hodnota pI odpovídá tzv. izoelektrickému bodu, jedná se o hodnotu pH, kdy je celkový náboj proteinu roven nule. Pro FOXO3<sub>156-269</sub> je hodnota pI = 10,24, tato hodnota byla získána pomocí nástroje ProtParam tool, dostupného na <https://web.expasy.org/protparam/>.

Protein byl nejprve nadávkován na kolonu, ekvilibrovanou pufrům pro kationtově-výměnnou chromatografii (složení viz tab. 4.7), poté byl eluován gradientem koncentrace NaCl. V průběhu gradientové eluce dochází k postupnému vytěsňování kladně nabitých molekul proteinu, vázaných na iontoměnič, kladně nabitými sodnými ionty. Byla použita Mono S<sup>®</sup> 5/50 GL kolona naplněná SP sepharosou s rychlostí průtoku mobilní fáze 1 ml/min.

Krok kationtově-výměnné chromatografie byl postupně vynechán díky postačující čistotě preparátu před tímto krokem. V důsledku toho byla rovněž vynechána dialýza do pufru pro kationtově-výměnnou chromatografii.

### 4.3.1.6 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie je chromatografická metoda sloužící k oddělování složek směsi na základě jejich různého hydrodynamického poloměru. Stacionární fázi je porézní silikagel, tzv. molekulové síto. V částicích stacionární fáze jsou

přítomny dutiny srovnatelného rozměru s velikostí separovaných molekul, díky nimž dochází k zadržování určitých komponent vzorku. Molekuly s vyšším hydrodynamickým poloměrem, než je rozměr pórů stacionární fáze, putují kolonou stejnou rychlostí, jako je rychlost průtoku mobilní fáze. Molekuly s nižším hydrodynamickým poloměrem difundují do různé hloubky pórů, a tím jsou různě zadržovány, zároveň platí, že čím nižší je hydrodynamický poloměr molekuly, tím hlouběji molekula proniká systémem pórů a je zadržována déle (Opekar *et al.*, 2010).

Objem dávkovaný na kolonu, tj. objem dávkovací smyčky, je 2 ml. Roztok proteinu musel být před nadávkováním na kolonu zakoncentrován na výsledný objem menší než 2 ml. Protein byl koncentrován centrifugací při 2800 rpm a teplotě 4 °C v koncentrátoru, který má v sobě polopropustnou membránu propouštějící molekuly do určité velikosti. Při zakoncentrovávání roztoku proteinu FOXO3<sup>156-269</sup> byl použit koncentrátor, který propouští molekuly o molární hmotnosti do 10 kDa.

Při gelové permeační chromatografii byl jako mobilní fáze použit fosfátový pufr o pH = 6,5 (složení viz tab. 4.8), byla použita kolona HiLoad<sup>TM</sup> 26/600 Superdex<sup>TM</sup> 75 pg s rychlostí průtoku 2 ml/min.

Tab. 4.8 Složení fosfátového pufru pro gelovou permeační chromatografii, 1 l, pH = 6,5

<u>Chemikálie</u>	<u>Odměřené množství</u>
KCl	3,73 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,14 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2,26 g
TCEP	0,287 g
glycerol	100 g

### 4.3.2 SDS-PAGE

SDS-PAGE (z angl. sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis), elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsíranu sodného, je analytická metoda separace proteinů na základě jejich různé elektroforetické mobility v prostředí polyakrylamidového gelu v elektrickém poli. Elektroforetická mobilita závisí přímo úměrně na celkovém náboji a nepřímo úměrně na délce polypeptidového řetězce, závisí ale i na stupni denaturace, tj. na rozbalení polypeptidového řetězce. Dodecylsíran

sodný je detergent, který se váže na protein, denaturuje ho a uděluje mu záporný náboj, který je pro většinu proteinů rozdělen rovnoměrně na jednotku hmoty. Aby došlo k úplné denaturaci a snadnému navázání dodecylsírany sodného byly vzorky před nanesením na gel zahřívány při 100 °C po dobu 5 minut. Během SDS-PAGE tak proteiny putují polyakrylamidovým gelem v elektrickém poli směrem k anodě různou rychlostí v závislosti na délce jejich polypeptidového řetězce, resp. molární hmotnosti. Pro SDS-PAGE byl použit 15% polyakrylamidový rozdělovací gel, který je sesítován bisakrylamidem, velikost pórů v gelu je určena poměrem akrylamidu a bisakrylamidu použitých při jeho přípravě, ten je vždy 37,5 : 1. Rozdělovací gel byl pro účel fokusace vzorku převrstven zaváděcím gelem o nižší koncentraci polyakrylamidu (4 %), ve kterém dochází k zaostření zón ve vzorku (Ryšlavá *et al.*, 2012).

Při přípravě vzorků pro 15% SDS-PAGE bylo pipetováno 5 µl 1x koncentrovaného pufru pro přípravu vzorků (složení 5× koncentrovaného pufru viz tab. 4.14 str. 37) a 10 µl analyzovaného roztoku proteinů. Takto připravené vzorky byly zahřívány při 100 °C po dobu pěti minut, poté byly naneseny na gel. Do první jamky gelu bylo pipetováno 5 µl proteinového standardu, do následujících jamek bylo postupně pipetováno 10 µl jednotlivých vzorků. Elektroforéza probíhala v přítomnosti 1× koncentrovaného pufru pro SDS elektroforézu (složení 10× koncentrovaného pufru viz tab. 4.13, str. 37), jako elektrolytu, při konstantním napětí 200V po dobu 50 minut.

Po skončení elektroforézy byly gely vizualizovány pomocí Coomassie R-250 podle protokolu uvedeného v literatuře (Lawrence a Besir, 2009). Barvicí roztok byl připraven navážením 0,08 g Coomassie Brilliant Blue G-250, tato navážka byla rozpuštěna v 1 l deionizované vody. Tmavě modrý roztok byl míchán po dobu 2 hodin, následně byly do roztoku přidány 3 ml 35% kyseliny chlorovodíkové, roztok byl míchán po dobu jedné minuty a následně skladován v temnu.

Gely byly nejprve zahřáty k varu s cca 200 ml deionizované vody, byly ponechány vychladnout po dobu asi 20 minut, následně byly přeneseny do cca 200 ml barvicího roztoku pro vizualizaci polyakrylamidových gelů pomocí Coomassie (složení viz tab. 4.15, str. 37). Byly zahřáty k varu a ponechány zchladnout po dobu asi 5 minut, barvicí roztok byl slit. Gely byly přeneseny do 200 ml deionizované vody, opět byly zahřáty k varu, poslední krok byl opakován dle potřeby.

*Tab. 4.9 Složení 4% zaváděcího gelu pro SDS-PAGE*

<u>Chemikálie</u>	<u>Odměřené množství</u>
akrylamid-bisakrylamid	0,25 ml
pufř pro zaváděcí gel (složení viz tab. 4.10)	465 $\mu$ l
deionizovaná voda	1,125 ml
10% persulfát amonný	25 $\mu$ l
TEMED	7,5 $\mu$ l

*Tab. 4.10 Složení pufřu pro 4% zaváděcí gel*

<u>Chemikálie</u>	<u>Odměřené množství</u>
1M Tris-HCl (pH = 6,8)	50 ml
10% SDS	4 ml
deionizovaná voda	46 ml

*Tab. 4.11 Složení 15% polyakrylamidového separačního gelu pro SDS-PAGE*

<u>Chemikálie</u>	<u>Odměřené množství</u>
akrylamid-bisakrylamid	1,875 ml
pufř pro separační gel (složení viz tab. 4.12)	0,95 ml
deionizovaná voda	0,875 ml
10% persulfát amonný	25 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l

*Tab. 4.12 Složení pufřu pro 15% separační gel*

<u>Chemikálie</u>	<u>Odměřené množství</u>
2M Tris-HCl (pH = 8,8)	75 ml
10% SDS	4 ml
deionizovaná voda	21 ml

Tab. 4.13 Složení pufru pro SDS elektroforézu, 10×

<u>Chemikálie</u>	<u>Odměřené množství</u>
Tris	30 g
glycin	144 g
SDS	10 g

Tab. 4.14 Složení pufru pro přípravu vzorků, 5×

<u>Chemikálie</u>	<u>Odměřené množství</u>
1M Tris-HCl (pH = 6,8)	0,6 ml
50% glycerol	5 ml
10% SDS	2 ml
β-merkaptoethanol	0,5 ml
1% bromfenolová modř	1 ml
deionizovaná voda	0,9 ml

Tab. 4.15 Složení barvicího roztoku pro vizualizaci polyakrylamidových gelů pomocí Coomassie, 1l

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

### 4.3.3 Stanovení koncentrace proteinu FOXO3<sub>156-269</sub> a výtěžku purifikace

Koncentraci proteinů je možné stanovit prostřednictvím měření absorbance vzorku při 280 nm, kde absorbují aromatické aminokyseliny, tyrosin a tryptofan. Molární absorpční koeficient proteinu při 280 nm závisí na poměrném zastoupení těchto dvou aminokyselin. Koncentraci proteinu lze při známém extinkčním koeficientu vypočítat z Lambertova-Beerova zákona

$$A_{280} = \varepsilon_{280} \cdot c \cdot l, \quad (2)$$

kde  $A_{280}$  je absorbance při 280 nm,  $\epsilon_{280}$  je molární absorpční koeficient při 280 nm,  $[\epsilon_{280}] = \text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $c$  je koncentrace proteinu,  $[c] = \text{mol dm}^{-3}$ , a  $l$  je délka optického prostředí,  $[l] = \text{cm}$ .

Pro koncentraci proteinu ve vzorku po úpravě rovnice (2) platí:

$$c = \frac{A_{280}}{\epsilon_{280} \cdot l}. \quad (3)$$

Molární absorpční koeficient proteinu FOXO3<sub>156-269</sub> byl vypočten nástrojem ProtParam tool, dostupným z <https://web.expasy.org/protparam/>,

$$\epsilon_{280} = 33\,460 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}.$$

Ze známé koncentrace proteinového preparátu je možné vypočíst výtěžek preparace podle vztahu

$$m = V \cdot c \cdot M, \quad (4)$$

kde  $V$  je objem vzorku,  $[V] = \text{dm}^3$ , a  $M$  je molární hmotnost proteinu FOXO3<sub>156-269</sub>,  $M = 13\,348 \text{ g/mol}$ .

#### 4.3.4 Purifikace <sup>15</sup>N značeného proteinu FOXO3<sub>156-269</sub>

Purifikace <sup>15</sup>N značeného proteinu FOXO3<sub>156-269</sub> se liší od purifikace neznačeného proteinu pouze ve složení živného média pro růst bakterií, kde je potřeba zabezpečit, aby jediným zdrojem dusíku byl izotop <sup>15</sup>N, jehož zdrojem je <sup>15</sup>N značený chlorid amonný. Značený protein byl exprimován v buňkách *E. coli*, jejichž kolonie byly pěstovány v osmi litrech obohaceného minimálního média připraveného podle protokolu, který poskytl Ing. Václav Veverka, Ph.D. (ÚOCHB AV ČR, v.v.i).

Pro přípravu obohaceného minimálního média byl do osmi 1l Erlenmeyerových baněk postupně přidán 1 g <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl, jako jediný zdroj dusíku, 100 ml roztoku 1 (složení viz tab. 4.16, str. 39), 1 ml filtrovaného roztoku 2 (složení viz tab. 4.17, str. 39), 10 ml roztoku 3 (složení viz tab. 4.18, str. 39) a 864 ml deionizované vody, takto připravená média byla vysterilizována, dále byly vysterilizovány i roztoky 4, 5, 6 a 7. Bylo založeno několik buněčných kultur. Do 3×8 skleněných zkumavek (tři na každý litr obohaceného minimálního média) obsahujících 5 ml LB médium (Luria Bertani) (složení LB média viz tab. 4.1, str. 29) bylo pipetováno 5 µl roztoku ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml. Poté bylo do každé zkumavky pipetováno 5 µl glycerolové konzervy, obsahující 700 µl buněčné

kultury a 300 µl sterilního glycerolu. Zkumavky byly uzavřeny kovovými víčky a byly ponechány inkubovat přes noc při 180 rpm a teplotě 37 °C.

Druhý den byl do každé z 11 Erlenmeyrových baněk přidán 1 ml filtrovaného roztoku 4 (složení viz tab. 4.19, str. 40), 1 ml roztoku 5 (složení viz tab. 4.20, str. 40), 1 ml roztoku 6 (složení viz tab. 4.21, str. 40), 1 ml roztoku 7 (složení viz tab. 4.22, str. 40), 4 g bezvodé D-glukózy a 1 ml zásobního roztoku ampicilinu o koncentraci 10 mg/ml. Přes noc narostlé buněčné kultury bylo nutné očistit od LB média, proto byly centrifugovány v 50ml plastových zkumavkách při 3500 rpm po dobu pěti minut, supernatant byl slit a peleta byla resuspendována v obohaceném minimálním médiu, tento postup byl opakován ještě 2×. Dále bylo postupováno stejně jako při purifikaci neznačeného proteinu FOXO3<sub>156-269</sub> (viz oddíl 4.3.1, str. 28 – 34).

*Tab. 4.16 Složení roztoku 1 pro obohacená min. média, 1 l*

<u>Chemikálie</u>	<u>Odměřené množství</u>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	89 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 g
NaCl	5 g

*Tab. 4.17 Složení roztoku 2 pro obohacená min. média*

<u>Chemikálie</u>	<u>Odměřené množství</u>
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·10H <sub>2</sub> O	1,93 g
deionizovaná voda	20 ml

*Tab. 4.18 Složení roztoku 3 pro obohacená min. média, 200 ml*

<u>Chemikálie</u>	<u>Odměřené množství</u>
EDTA (rozpuštěno ve 160 ml dH <sub>2</sub> O, pH upraveno na 7)	1 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,5 g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,16 g
ZnCl <sub>2</sub>	10 mg
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,5 mg
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	3,7 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2 mg

*Tabulka 4.19 – Složení roztoku 4 pro obohacená min. média*

<u>Chemikálie</u>	<u>Odměřené množství</u>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,9 g
deionizovaná voda	20 ml

*Tabulka 4.20 – Složení roztoku 5 pro obohacená min. média*

<u>Chemikálie</u>	<u>Odměřené množství</u>
CaCl <sub>2</sub>	0,66 g
deionizovaná voda	20 ml

*Tabulka 4.21 – Složení roztoku 6 pro obohacená min. média*

<u>Chemikálie</u>	<u>Odměřené množství</u>
D-biotin	10 mg
50% roztok ethanolu	10 ml

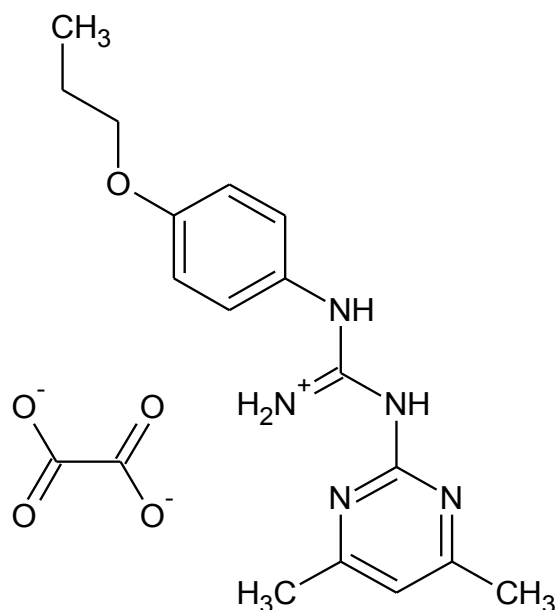
*Tabulka 4.22 – Složení roztoku 7 pro obohacená min. média*

<u>Chemikálie</u>	<u>Odměřené množství</u>
thiamin	10 mg
deionizovaná voda	10 ml

### **4.3.5 Sloučenina S9 oxalát a odhad její koncentrace**

V této práci byl zkoumán vliv nízkomolekulární sloučeniny N-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)-N'-(4-propoxyphenyl)guanidinium oxalátu, dále pouze S9 oxalát (struktura viz obr. 4.2, str. 41), na interakci DNA-vazebné domény FOXO3 proteinu s DNA. Jedná se o sůl sloučeniny S9 (viz. obr. 2.9, str. 22) s kyselinou šťavelovou, která má vyšší rozpustnost ve vodě než samotná sloučenina S9. Sloučenina S9 oxalát byla syntetizována skupinou doc. RNDr. Jana Veselého, PhD. a byla dodána v podobě bílého prášku.





Obr. 4.2 Struktura sloučeniny S9 oxalát. Struktura sloučeniny S9 oxalát byla nakreslena v programu ACD/ChemSketch, Freeware version, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, On, Canada, www.acdlabs.com, 2015.

Pro další měření bylo nezbytné odhadnout koncentraci nasyceného roztoku sloučeniny S9 oxalát rozpuštěné v pufru pro NMR měření. Rozpustnost této sloučeniny ve vodě, respektive v pufru pro NMR měření (složení viz tab. 4.27, str. 48), je příliš nízká na to, aby mohl být připraven roztok o známé koncentraci rozpuštěním přesné navážky v pufru pro NMR měření. Pro odhad koncentrace sloučeniny S9 oxalát byla použita metoda jednobodové kalibrace. Jako standardní roztok o známé koncentraci byl použit zředěný roztok S9 oxalátu rozpuštěného v dimethylsulfoxidu, ve kterém je S9 oxalát možné rozpustit zcela. Byl připraven 20mM roztok sloučeniny S9 oxalát v dimethylsulfoxidu, tento roztok byl 1000x zředěn pufrům pro NMR měření a bylo změřeno jeho absorpční spektrum. Nasycený roztok S9 oxalátu byl rovněž 1000x zředěn pufrům pro NMR měření a bylo změřeno jeho absorpční spektrum. Při metodě jednobodové kalibrace pro koncentraci sloučeniny S9 oxalát platí:

$$c = \frac{A_{\lambda} \cdot c(st)}{A_{\lambda}(st)} \quad (5)$$

Absorpční spektra byla měřena na spektrofotometru UV-1800 s Peltierovým termostatem S-1700, Shimadzu. Pro měření byly použity křemenné kyvety, které propouští záření v UV oblasti.

Absorpční spektrum je ovlivněno přítomností DMSO (viz obr. 5.11, str. 64), proto nemohla být pro výpočet koncentrace použita vlnová délka odpovídající absorpčnímu maximu sloučeniny S9 oxalát (235 nm), kdy je výpočet nejpřesnější. Místo vlnové délky odpovídající absorpčnímu maximu byla zvolena vlnová délka 270 nm, kde neabsorbuje v roztoku přítomný DMSO.

### 4.3.6 Příprava dvouvláknové DNA z oligonukleotidů

Pro přípravu dvouvláknové DNA byly použity dvě komplementární, jednovláknové oligonukleotidové sekvence o délce 17 párů bází, a to IRE-up a IRE-down (IRE z angl. insulin response element) od firmy Generi Biotech, s.r.o.

IRE-up nukleotidová sekvence:

5'-GAC TAT CAA AAC GC-3'

IRE-down nukleotidová sekvence:

5'-GCG TTG TTT TGA TAG TC-3'

IRE nukleotidový motiv je podtržen.

Oligonukleotidy byly nejprve zředěny deionizovanou vodou na výslednou koncentraci 1mM podle instrukcí výrobce. Pro přípravu dvoušroubovice DNA bylo pipetováno 50,0 µl 1mM roztoku IRE-up oligonukleotidu, 50,0 µl 1mM roztoku IRE-down oligonukleotidu a 1,000 µl 3M roztoku NaCl. Vzniklý roztok byl krátce promíchán vortexem a poté byl zahříván v suchém ohříváči při 70 °C po dobu pěti minut, následně byl inkubován po dobu 20 minut při 23 °C, poté byl uchováván při – 20 °C.

### 4.3.7 EMSA

Při EMSA (Electrophoretic mobility gelshift assay) dochází k rozdělování látek v elektrickém poli na základě jejich různé elektroforetické mobility v prostředí polyakrylamidového gelu. EMSA probíhá za nedenedaturujících podmínek jako nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu, proteiny si během ní zachovávají svou nativní konformaci (jsou přirozeně sbaleny) a biologickou funkci. Elektroforetická mobilita proteinu při EMSA tak nezávisí pouze na jeho molekulové hmotnosti a rozdělení náboje, ale i na jeho stupni sbalení a tvaru.

Pro nativní elektroforézu byly použity 12% polyakrylamidové gely (složení viz tab. 4.24, str. 44). Nativní elektroforéza byla provedena v elektroforetické vaně naplněné 1× koncentrovaným TBE pufrům (složení 10× koncentrovaného TBE pufru viz tab. 4.25, str. 45). Při nativní elektroforéze v TBE pufru (pH = 8,3) je protein FOXO3<sub>156-269</sub> nabit kladně (teoretická hodnota pI = 10,24), putuje ke katodě a nevstupuje do gelu. Komplex proteinu a DNA-IRE a volná DNA-IRE jsou nabity záporně díky fosfátovým skupinám v cukr-fosfátové kostře DNA a putují tedy v prostředí gelu ke kladně nabitě anodě. Elektroforetická vana byla ponořena do vodní lázně s ledem, aby tak bylo zajištěno chlazení aparatury, a tím udržení nativní konformace proteinu. Při každé nativní elektroforéze byly vzorky paralelně nanášeny na dva gely, které byly podrobeny elektroforéze současně. Pro vizualizaci gelů byly použity dvě různé metody. Jeden z gelů byl barven pomocí Coomassie (viz oddíl 4.3.2, str. 34), tato metoda umožňuje vizualizaci proteinů v polyakrylamidovém gelu. Druhý gel byl barven pomocí stříbrných iontů, tato metoda umožní vizualizaci DNA (Bassam a Caetano-Anollés, 1993). Gel barvený pomocí Coomassie je důležitou kontrolou, že v každém vzorku je přítomno stejné množství proteinu.

Vzorky pro EMSA byly připravovány na ledu. Jednotlivé složky byly pipetovány v pořadí: fosfátový pufr pro NMR měření (složení viz tab. 4.27, str. 48), deionizovaná voda, roztok MgCl<sub>2</sub>, FOXO3<sub>156-269</sub>, roztok sloučeniny S9 oxalát rozpuštěné ve fosfátovém pufru pro NMR měření. Následovala inkubace vzorků na ledu po dobu 20 minut, poté byla ke vzorkům přidána dvouvláknová DNA-IRE. Vzorky byly inkubovány 5 minut na ledu. Ke každému vzorku bylo přidáno 10 µl vzorkového pufru pro nativní elektroforézu (složení viz tab. 4.23, str. 44). Vzorky byly nanášeny na gely, nativní elektroforéza probíhala při napětí 150 V po dobu 1,5 hodiny.

Po skončení elektrolýzy byly gely 2× vizualizovány. Protokol pro barvení gelů ionty stříbra byl upraven tak, že byly vizualizovány pouze molekuly DNA, na jejichž záporně nabitou cukr-fosfátovou kostru se adsorbují stříbrné ionty. Ty jsou poté selektivně redukovány formaldehydem na kovové stříbro. Minimalizaci pozadí při barvení zajišťuje přídavek Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, který tvoří komplex s přebytečnými Ag<sup>+</sup> ionty (Bassam, Caetano-Anollés a Gresshoff, 1991).

Při barvení 12% akrylamidového gelu stříbrem byly gely nejprve inkubovány s 1% (v/v) kyselinou dusičnou po dobu 15 minut. Následně byly gely důkladně opláchnuty deionizovanou vodou a byly přeneseny do roztoku 75 ml deionizované vody s přídavkem 0,5 ml 30% dusičnanu stříbrného. V tomto roztoku byly gely inkubovány po dobu 15 minut.

Poté byly gely důkladně opláchnuty deionizovanou vodou a byly přeneseny do redukčního roztoku (složení viz tab. 4.26), kde byly vyvolány. Vyvolání gelů redukčním roztokem probíhalo v závislosti na přesnosti přípravy použitých roztoků, a to zejména redukčního roztoku, po dobu cca 20 minut. Vyvíjení gelů bylo zastaveno jejich rychlým přenesením do 10% vodného roztoku kyseliny octové.

*Tab. 4.23 Složení vzorkového pufru pro nativní elektroforézu*

<u>Chemikálie</u>	<u>Odměřené množství</u>
TBE pufr 10x (složení viz tab. 4.25, str. 45)	1 ml
bromfenolová modř	10 mg
glycerol	3 ml

*Tab. 4.24 Složení 12% polyakrylamidového gelu pro nativní elektroforézu*

<u>Chemikálie</u>	<u>Odměřené množství</u>
TBE pufr 10x	0,60 ml
Rotiphorese Gel 30	3,40 ml
deionizovaná voda	2,97 ml
10% APS	30,0 $\mu$ l
TEMED	7,5 $\mu$ l

*Tab. 4.25 Složení TBE pufru 10x, II*

<u>Chemikálie</u>	<u>Odměřené množství</u>
TRIS	108 g
kyselina boritá	55 g
0,5M roztok EDTA (pH = 8)	40 ml

*Tab. 4.26 Složení redukčního roztoku pro vizualizaci nativních polyakrylamidových gelů stříbrem*

<u>Chemikálie</u>	<u>Odměřené množství</u>
3% roztok $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	75 ml
2,25% roztok $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	6,60 $\mu$ l
37% roztok formaldehydu	37,5 $\mu$ l

### 4.3.8 Nukleární magnetická rezonance

Jádra s nenulovým spinovým kvantovým číslem,  $I$ , mají zároveň nenulový magnetický dipólový moment,  $\mu$ . Nukleární magnetická rezonance je spektrální metodou, která využívá jejich magnetických vlastností. Mezi nejčastěji měřená jádra patří jádra se spinovým kvantovým číslem  $\frac{1}{2}$ , jedná se např. o jádra  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  a  $^{13}\text{C}$ , z nichž jádra  $^1\text{H}$  mají nejvyšší přirozené zastoupení (99,99%) a zároveň nejvyšší citlivost. Jádra se spinovým kvantovým číslem větším než  $\frac{1}{2}$  mají zároveň kvadrupólový moment a jsou často těžko měřitelná (Dračínský, 2009).

Spinový moment hybnosti,  $\vec{I}$ , může zaujmout  $2I + 1$  orientací, pro jádra s  $I = \frac{1}{2}$  jsou to právě dvě možné orientace spinového momentu hybnosti. Z-ová složka magnetického dipólového momentu, příslušející těmto dvěma orientacím nabývá hodnot:

$$\mu_z = \pm 1/2 \gamma \hbar, \quad (6)$$

kde  $\hbar$  je redukovaná Planckova konstanta a  $\gamma$  je gyromagnetický poměr daného jádra.

V magnetickém poli dochází ke štěpení energetických hladin, příslušejících jednotlivým hodnotám magnetického dipólového momentu. Energie hladiny je dána vztahem:

$$E = -\mu_z \cdot B_z, \quad (7)$$

kde  $B_z$  je složka vektoru magnetické indukce ve směru osy z.

Důsledkem silového působení magnetického pole je precesní pohyb spinů s frekvencí Larmorovy precese:

$$\nu = \frac{\gamma B_z}{2\pi}, \quad (8)$$

kteřá je zároveň rezonanční podmínkou, tj. záření v oblasti radiových vln s frekvencí Larmorovy precese excituje spiny do vyšší energetické hladiny. Efektivní hodnota  $B_z$  je pro různá jádra stejného izotopu různá a závisí na chemickém okolí těchto jader, neboť vnější magnetické pole je různě stíněno elektrony, které dané jádro obklopují (Cavanagh *et al.*, 2007).

NMR spektrum je závislostí intenzity na chemickém posunu, což je relativní veličina definovaná jako:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_0}{\nu_0} \cdot 10^6, \quad (9)$$

kde  $\nu_0$  je rezonanční frekvence referenčního jádra a  $\nu$  je rezonanční frekvence daného jádra, pro nějž definujeme chemický posun, chemický posun se udává v ppm (Cavanagh *et al.* 2007).

Intenzita signálů v NMR spektru je přímo úměrná rozdílu populací energetických hladin spinů. Malý přebytek spinů v nižším energetickém stavu způsobí, že vektor celkové magnetizace je nenulový a směřuje podél osy z. Pomocí  $90^\circ$  pulzu lze vektor magnetizace sklopit do roviny xy a následně precedující vektor magnetizace detekovat pomocí detekčních cívek jako signál volně dohasínající indukce (FID). Aplikací Fourierovy transformace na závislost indukovaného proudu na čase získáme spektrum ve frekvenční doméně (Dračínský, 2009).

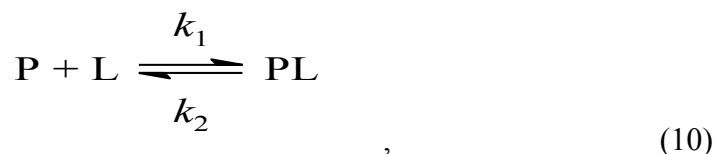
#### 4.3.8.1 2D $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC experiment

Užití 2D experimentů umožňuje "zředění" informace obsažené v 1D spektrech do dvou dimenzí, zároveň poskytuje některé cenné informace v závislosti na typu použitého experimentu. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC (heteronukleární jedno-kvantová korelace) experiment měří korelaci chemických posunů jader  $^1\text{H}$  a  $^{15}\text{N}$  spojených chemickou vazbou, tj. ve spektru pozorujeme tzv. kroszíky mezi přímými sousedy (Cavanagh *et al.* 2007). Ve spektru jsou viditelné zejména korelace pocházející od amidických skupin peptidových vazeb, pozorujeme ale i korelace některých  $-\text{NH}$  a  $-\text{NH}_2$  skupin postranních řetězců aminokyselin (Trp, Asn, Gln). Aby byly pozorovatelné všechny korelace amidických skupin polypeptidového řetězce, je nutné 100% izotopové obohacení proteinu izotopem dusíku  $^{15}\text{N}$ . Během experimentu dochází k přenosu magnetizace protonů ( $^1\text{H}$  jader) prostřednictvím skalární  $J_{\text{NH}}$  interakce na  $^{15}\text{N}$  jádra v přímém sousedství, vývoji chemickým posunem  $^{15}\text{N}$  jader (vývoj v nepřímé doméně) a zpětnému přenosu magnetizace  $J_{\text{NH}}$  skalární interakcí zpět na magnetizaci  $^1\text{H}$  jader, která je poté přímo detekována (přímá doména).

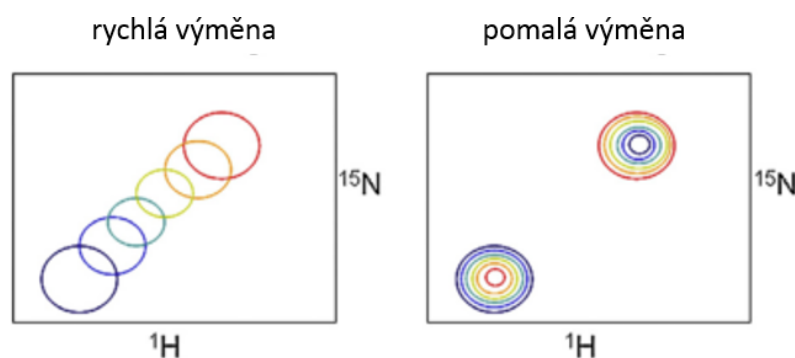
Chemické posuny jader  $^1\text{H}$  a  $^{15}\text{N}$  závisí na jejich chemickém okolí, resp. na rozložení hustoty okolních elektronů, které lokálně odstiňují vnější magnetické pole. Při vazbě ligandu na protein dojde ke změně chemického okolí, a tím i chemického posunu některých  $^1\text{H}$  a  $^{15}\text{N}$  jader proteinu. Získání série 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spekter s různou koncentrací ligandu, tj. provedení titrace ligandu, a vyhodnocení změny chemických posunů jader  $^1\text{H}$  a  $^{15}\text{N}$ , CSP (perturbance chemického posunu), poskytuje informaci o

reziduích, která se účastní vazby ligandu nebo jsou touto vazbou stericky ovlivněna (Williamson, 2013).

Vazba ligandu na protein, pokud se ligand váže pouze na jedno vazebné místo, může být popsána zjednodušeným schématem:



kde  $k_1$  a  $k_2$  jsou rychlostní konstanty pro přímou a pro zpětnou reakci. Je-li  $k_2$ ,  $[k_2] = \text{s}^{-1}$ , řádově nižší než rozdíl chemických posunů NMR aktivních jader vázané a volné formy proteinu v Hz, pak signály volného proteinu při titraci ligandem (inhibitorem) postupně ubývají na intenzitě, zatímco intenzita signálů vázané formy postupně roste. Je-li  $k_2$  řádově vyšší, než je rozdíl chemických posunů NMR aktivních jader volné a vázané formy proteinu v Hz, signály se při titraci ligandem pohybují z původní pozice, odpovídající signálům NMR aktivních jader volného proteinu, na signály odpovídající vázané formě. V každém bodě titrace je chemický posun signálu roven populačně váženému průměru chemických posunů NMR aktivních jader vázané a volné formy proteinu. Vynesením závislosti změny chemického posunu, CSP, na koncentraci inhibitoru lze získat titrační křivku, a poté i  $K_D$  pro vazbu protein-ligand (Williamson, 2013).



Obr. 4.3 Znárodnění možných trendů změn chemických posunů při sérii 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC experimentů s různou koncentrací ligandu. Spektrum nalevo reprezentuje rychlou výměnu, kde  $k_2$  je mnohem větší než rozdíl chemických posunů  $^1\text{H}$  a  $^{15}\text{N}$  jader volné a vázané formy v Hz, chemický posun v libovolném bodě titrace je populačně váženým průměrem chemických posunů těchto jader volné a vázané formy proteinu. Spektrum napravo reprezentuje pomalou výměnu, kdy  $k_2$  je mnohem nižší než rozdíl chemických posunů volné a vázané formy v Hz. Převzato a upraveno z (Williamson, 2013).

Škály chemických posunů jader  $^1\text{H}$  a  $^{15}\text{N}$  jsou různé a chemické posuny těchto jader jsou ovlivněny různými faktory, proto musí být při jejich vyhodnocení váženy. Byla

vypočtena relativní změna chemického posunu, relativní CSP. Relativní CSP byla vypočtena jako:

$$d = \sqrt{\frac{1}{2}(\delta_H^2 + 0,2\delta_N^2)} \quad (11)$$

kde  $\delta_H$  a  $\delta_N$  jsou rozdíly chemických posunů jader  $^1\text{H}$  a  $^{15}\text{N}$  v ppm (Williamson, 2013).

Spektra byla měřena na 850MHz NMR spektrometru Bruker Avance III v ÚOCHB AV ČR, v.v.i. Vzorky byly měřeny v Shigemi kyvetách, vyrobených ze skla, které má stejné magnetické vlastnosti (magnetickou susceptibilitu) jako pufr použitý pro měření. Použití kyvet Shigemi umožňuje měření s menším objemem vzorku, neboť měřicí přístroj vyžaduje stejnou magnetickou susceptibilitu vzorku přes určitý prostor. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC měření byla provedena a vyhodnocena RNDr. Katarínou Pšenákovou.

### Příprava vzorků pro 2D $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC experiment

Pro 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC experiment bylo připraveno 5 vzorků o celkovém objemu 350  $\mu\text{l}$ . Každý vzorek obsahoval protein FOXO3<sub>156-269</sub> o výsledné koncentraci 250  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  v pufru pro NMR měření (složení viz tabulka 4.27) a 10% D<sub>2</sub>O (jádra deuteria se používají pro uzamčení magnetického pole v čase). Vzorky 1-5 obsahovaly rostoucí koncentraci inhibitoru S9 oxalát (titrace), a to po řadě 0; 1,5; 3; 4,5; a 7  $\text{mmol dm}^{-3}$ .

Tab. 4.27 – Složení fosfátového pufru pro NMR měření, 1 l, pH = 6,5

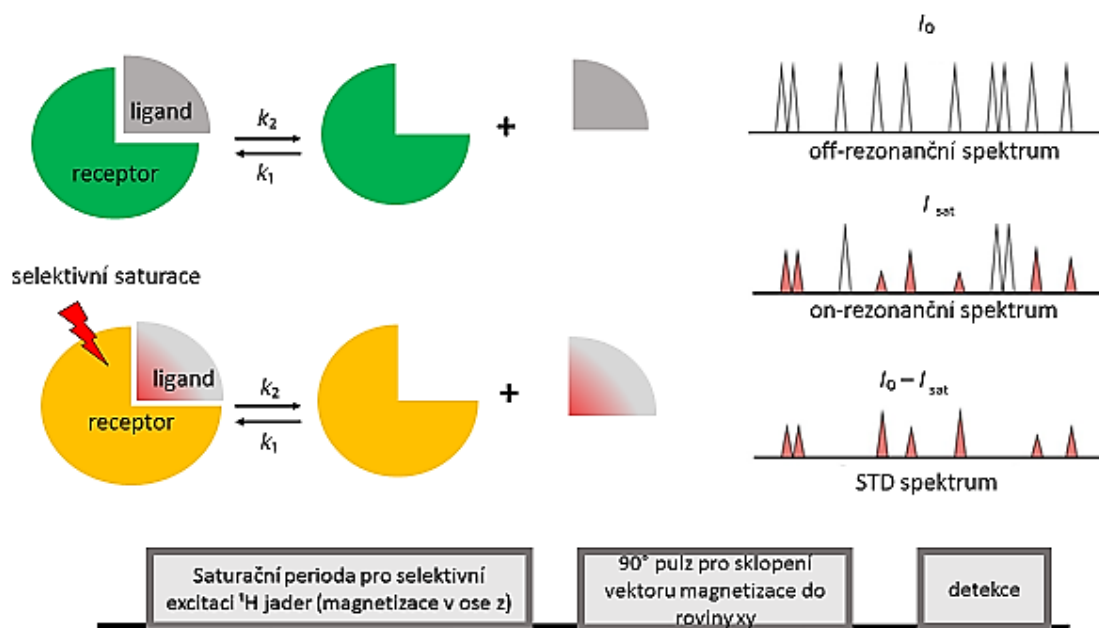
Chemikálie	Odměřené množství
KCl	3,73 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,14 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2,26 g

### 4.3.8.2 STD NMR experiment

STD (rozdíl přenesené saturace, z angl. Saturation Transfer Difference) NMR experiment je další technikou umožňující studium interakcí receptoru a ligandu v roztoku. Tento experiment měří magnetizaci přenesenou z proteinu (receptoru) na něj navázaný ligand přímým pozorováním NMR signálů ligandu (Venkitakrishnan *et al.*, 2012). STD-NMR experiment je založen na přenosu magnetizace prostřednictvím nukleárního



Overhauserova efektu. Nukleární Overhauserův efekt, zkr. NOE, je důsledkem přímé dipól-dipólové interakce mezi dvěma NMR aktivními jádry. Relaxace dvou NMR aktivních jader s přímou dipól-dipólovou interakcí jsou vzájemně provázané procesy. Změna spinového stavu jednoho jádra ovlivní spinový stav druhého jádra, dochází k takzvané křížové relaxaci. Amplituda dipól-dipólové interakce je přímo úměrná reciproké šesté mocnině vzdálenosti, z čehož plyne, že čím menší bude vzdálenost dvou jader v prostoru, tím silnější bude NOE a s ním spojený přenos magnetizace (Cavanagh *et al.* 2007).



Obr. 4.4 Schéma STD experimentu. Na obrázku je zachycen princip STD NMR experimentu. STD spektrum je získáno jako rozdíl off-rezonančního spektra s nezměněnými intenzitami signálů,  $I_0$ , a on-rezonančního spektra se změněnými intenzitami signálů v důsledku NOE. Zjednodušené schéma v dolní části obrázku popisuje princip získání off-rezonančního a on-rezonančního spektra.

Prvním krokem STD NMR experimentu je získání tzv. off-rezonančního spektra. Vzorek je po určitou dobu, saturační perioda, (typicky 0,5-5 s) selektivně ozařován radiofrekvenčním zářením, jehož frekvence leží mimo rozsah rezonančních frekvencí  $^1\text{H}$  jader přítomných ve vzorku. Během této doby nedochází k excitaci, tj. změně energetických stavů spinů  $^1\text{H}$  jader, následuje pulz, který sklopí vektor magnetizace do roviny xy a detekce. Výsledkem je standardní  $^1\text{H}$  spektrum vzorku se signály  $^1\text{H}$  jader ligandu a proteinu s intenzitami  $I_0$  (Venkitakrishnan *et al.*, 2012).

Druhým krokem je získání tzv. on-rezonančního spektra. Během saturační periody (stejně jako v případě off-rezonančního spektra) jsou selektivně excitována  $^1\text{H}$  jádra  $-\text{CH}_3$  skupin proteinu (oblast od -1 do 0 ppm), v této spektrální oblasti se vyskytují pouze signály proteinu, nikoli ligandu. Dojde k saturaci těchto signálů způsobené iradiací vzbuzenými

rychlými přeskoky mezi energetickými hladinami spinů  $^1\text{H}$  jader  $-\text{CH}_3$  skupin. Saturace z  $^1\text{H}$  jader methylů je přenesena na ostatní  $^1\text{H}$  jádra proteinu prostřednictvím intramolekulárního NOE. Následně prostřednictvím intermolekulárního NOE dochází ke křížové relaxaci  $^1\text{H}$  jader proteinu a  $^1\text{H}$  jader ligandu. Vlivem intermolekulárního NOE dochází ke změně spinových stavů  $^1\text{H}$  jader ligandu, která se nachází v blízkosti  $^1\text{H}$  jader proteinu, a tudíž k přenosu magnetizace mezi  $^1\text{H}$  jádry proteinu a ligandu. V důsledku intermolekulárního NOE a změny spinových stavů těchto jader ligandu tak dochází ke snížení intenzit jejich signálů v  $^1\text{H}$  NMR spektru, tento efekt je dán relaxačními vlastnostmi spinů  $^1\text{H}$  jader receptoru a ligandu. Molekuly ligandu s přenesenou magnetizací se během saturační periody kumulují v roztoku, neboť disociace ligandu je mnohem rychlejší proces než podélná (spin-mřížková) relaxace spinů  $^1\text{H}$  jader rychle rotující malé molekuly (ligandu). Po saturační periodě následuje  $90^\circ$  pulz, který sklopí vektor magnetizace do roviny xy a detekce, výsledkem je  $^1\text{H}$  spektrum obsahující signály ligandu a proteinu s intenzitami  $I_{\text{sat}}$  (Venkitakrishnan *et al.*, 2012).

STD spektrum je získáno jako rozdíl off-rezonančního a on-rezonančního spektra, odtud výraz „difference“, a obsahuje signály  $^1\text{H}$  jader ligandu, která se nachází v blízkosti povrchu proteinu a signály  $^1\text{H}$  jader proteinu. STD experimenty jsou však měřeny s velkým nadbytkem ligandu. Platí, že čím blíže  $^1\text{H}$  jádrům proteinu se  $^1\text{H}$  jádra ligandu nachází, tím intenzivnější je jejich signál v STD spektru. STD experiment má nízký poměr signál/šum v důsledky dynamiky komplexu protein-ligand (Venkitakrishnan *et al.*, 2012).

Spektra byla měřena na 850MHz NMR spektrometru Bruker Avance III. Vzorky byly měřeny v Shigemi kyvetách. STD experiment byl naměřen a vyhodnocen RNDr. Katarínou Pšenákovou.

### **Příprava vzorku pro STD experiment**

Pro STD experiment byl připraven vzorek neznačeného proteinu FOXO3<sub>156-269</sub> o koncentraci  $15 \mu\text{mol dm}^{-3}$  a sloučeniny S9 oxalát o koncentraci  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$  v pufru pro NMR měření (složení viz tab. 4.27, str. 48) s 10% D<sub>2</sub>O.

### **4.3.9 Molekulové dokování**

Molekulové dokování je počítačové modelování interakce, mezi dvěma chemickými látkami, a to nejčastěji mezi nízkomolekulárním ligandem a proteinem, za

účelem predikce konformace rovnovážného stavu a do jisté míry i změny volné vazebné energie. Dokování vychází ze známé struktury proteinu i ligandu a skládá se ze dvou procesů: konformační vyhledávání a skórování (Šícho a Svozil, 2017).

Během konformačního vyhledávání se algoritmy snaží o pokrytí všech možných konformací proteinu a ligandu ve struktuře komplexu metodami, které jsou buď systematické, nebo stochastické. Při stochastickém vyhledávání je zpočátku náhodně generováno několik konfigurací, ze kterých jsou na základě pravděpodobnostních pravidel postupně vybírány energeticky nejvýhodnější konformace. Oproti tomu systematické vyhledávání postupně prozkoumává jednotlivé stupně volnosti systému a systematicky generuje dílčí řešení, která jsou dále optimalizována směrem ke stavu s nejnižší energií. Významnou roli v molekulovém dokování hrají skórující funkce, které jsou zodpovědné za identifikaci konformace, která je termodynamicky nejpravděpodobnější. Skórující funkce je matematický aparát vyhodnocující vazebné energie jednotlivých konfigurací. Skórující funkce je možné rozdělit do několika skupin podle charakteru. Mezi nejvýznamnější patří fyzikální skórující funkce, stanovující energii konkrétní konformace pomocí funkčního předpisu vycházejícího z klasické mechaniky, a empirické skórující funkce. Empirické skórující funkce aproximují změnu Gibbsovy vazebné energie pomocí vztahu:

$$\Delta G = \sum_i W_i \cdot \Delta G_i, \quad (12)$$

kde  $\Delta G_i$  je  $i$ -tý příspěvek ke změně volné energie a  $W_i$  je váha  $i$ -tého příspěvku, nastavená pomocí vícenásobné lineární regrese na základě experimentálně získaných dat (Šícho a Svozil, 2017).

Při tzv. flexibilním molekulovém dokování je zpravidla většina dihedrálních úhlů molekuly proteinu držena konstantní, tyto tvoří tzv. rigidní část, kdežto předem vybrané dihedrální úhly molekuly proteinu, tvořící tzv. flexibilní část, a ligandu jsou volně rotovatelné. Tento přístup byl využit v této práci.

Jedním z programů pro molekulové dokování je v této práci použitý AutoDock Vina (Trott a Olson, 2009), který umožňuje provádět výpočty v relativně krátkém čase. AutoDock Vina používá stochastický přístup konformačního vyhledávání, výpočty je tedy vhodné opakovat vícekrát. Skórující funkce, kterou AutoDock Vina používá je empirická, jednotlivé příspěvky jsou váženy a patří mezi ně například sterické interakce, van der Waalovy interakce a vodíkové vazby, naopak nezahrnuje například elektrostatické příspěvky (Trott a Olson, 2009). Vzhledem k tomu, že skórující funkce zahrnuje pouze

některé příspěvky potenciální energie systému, je vazebná energie určená výpočtem pouze hrubým odhadem.

Vstupními daty pro AutoDock Vina jsou struktura proteinu a ligandu v podobě pdbqt souborů, které obsahují informaci o souřadnicích všech atomů, parciálních nábojích a o rotovatelných vazbách, jak pro receptor, tak pro ligand. Pdbqt soubory jsou generovány z pdb souborů (ProteinDataBank formát) v programu AutoDockTools (Morris *et al.*, 2009). Při tvorbě pdbqt souborů AutoDock přidělí známým strukturám parciální náboje Gasteigerova typu na základě elektronegativity jednotlivých prvků, dále rozdělí atomy na typy podle toho, zda jsou schopny tvořit vodíkové vazby, či nikoli. Atomy H vázané nepolární vazbou jsou odstraněny. Rotovatelné vazby je nutné definovat a vytvořit tak dva pdbqt soubory pro receptor (protein). Jeden soubor obsahuje pouze rigidní část, druhý obsahuje pouze flexibilní část receptoru (Forli *et al.*, 2016.). AutoDock Vina v průběhu výpočtu považuje dihedrální úhly v rigidní části receptoru (proteinu) za konstantní, zatímco předem vybrané vazby v tzv. flexibilní části jsou volně rotovatelné. AutoDock Vina vyžaduje specifikaci místa (prostoru), ve kterém připadají v úvahu různé konformace ligandu a jeho různé orientace vůči molekule receptoru, tzv. “search space“. Tento prostor je v programu AutoDock Vina vymezen pomocí kvádrů, jehož rozměry a souřadnice středu jsou udávány v Å (Forli *et al.*, 2016).

#### 4.3.9.1 Příprava vstupních souborů pro molekulové dokování

Rezidua tvořící tzv. flexibilní část byla vybrána za základě vyhodnocení chemických posunů, relativní CSP, 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC NMR experimentu pro nejnižší koncentraci ligandu ve vzorku ( $1,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ). Změna chemického posunu je velmi citlivá na změnu struktury, téměř každá vazebná interakce produkuje CSP (Williamson, 2013). Píky, které se v průběhu titrace posunují nejvíce, velice pravděpodobně odpovídají reziduím, která reprezentují vazebný povrch pro sloučeninu S9 oxalát. Pro dokování bylo vybráno 14 reziduí s flexibilními postranními řetězci, v programu AutoDockTools, verze 1.5.6. byl vytvořen soubor flexible.pdbqt, pro flexibilní část, a soubor rigid.pdbqt reprezentující rigidní část. Oba tyto soubory byly vytvořeny s využitím vyřešené NMR struktury FOXO3-DBD (kód 2K86), stažené z Protein Data Bank jako pdb soubor (viz obr. 2.7, str. 19) (F. Wang *et al.*, 2008). Jako ligand byla použita struktura sloučeniny S9 (viz obr. 2.9, str. 22).

Struktura ligandu (S9) byla vytvořena pomocí programu HyperChem, v8.0.8, HyperChem(TM) Professional 8.0.8, Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, Florida 32601, USA. Následně byly i pro ligand definovány rotovatelné a nerotovatelné vazby v programu AutoDockTools, v1.5.6, rotace dvojně vazby guanidinové skupiny byla zablokována (viz obr. 5.18 str. 73). Zablokováním rotace dvojně vazby guanidinové skupiny vznikly dva isomery sloučeniny S9. Výpočty byly provedeny pro každý isomer zvlášť.

## 5 Výsledky

### 5.1 Exprese a purifikace neznačeného proteinu FOXO3<sub>156-269</sub>

Příprava DBD proteinu FOXO3 (sekvence 156-269) sestává z exprese a jeho následné purifikace. Purifikace FOXO3<sub>156-269</sub> zahrnuje několik hlavních kroků: GST afinitní chromatografii, dialýzu a odštěpení GST kotvy, kationtově-výměnnou chromatografii a gelovou permeační chromatografii. Čistota produktu byla po každém z těchto kroků kontrolována pomocí 15% SDS-PAGE. V rámci optimalizace purifikačního protokolu byl postupně vynechán krok kationtově-výměnné chromatografie.

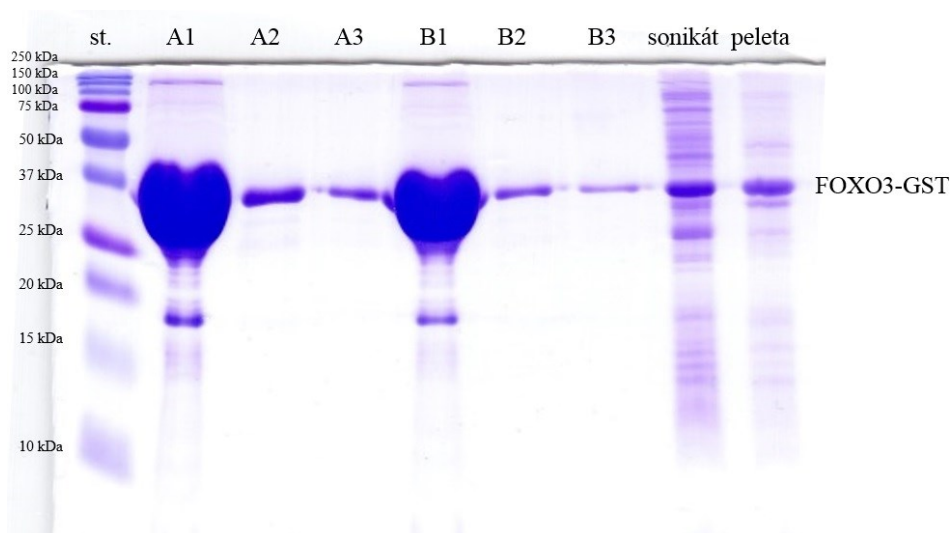
#### 5.1.1 Exprese a purifikace neznačeného proteinu FOXO3<sub>156-269</sub> s vynecháním kationtově-výměnné chromatografie

##### 5.1.1.1 Exprese

Expresa neznačeného proteinu FOXO3<sub>156-269</sub> probíhala v buňkách *E. coli*, kmen BL21(DE3) (viz oddíl 4.3.1.1, str. 28) po dobu 12 hodin při 20 °C, jejichž kolonie byly pěstovány v 6 l LB média (složení viz tab. 4.1, str. 29). FOXO3<sub>156-269</sub> je exprimován jako fúzní protein s GST kotvou na N-konci. Lyze buněk byla provedena podle postupu v oddílu 4.3.1.2, str. 29.

### 5.1.1.2 GST chromatografie

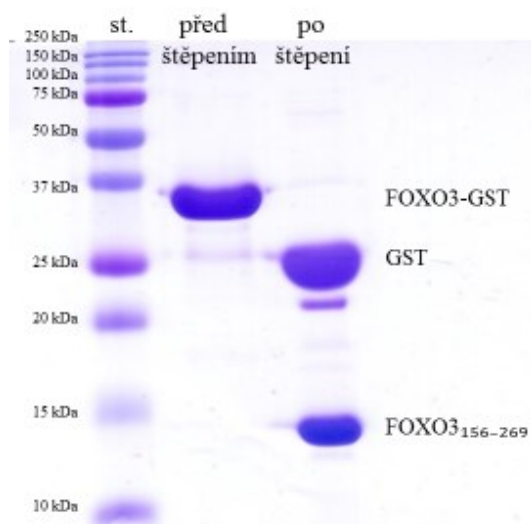
Podle postupu uvedeného v oddílu 4.3.1.3, str. 30 byly provedeny dvě paralelní GST chromatografie na 2 kolonách s 5 ml stacionární fáze. Jímáno bylo 2x6 frakcí po 10 ml. Vybrané frakce byly následně analyzovány pomocí 15% SDS-PAGE. Gel s analyzovanými frakcemi je na obr. 5.1.



*Obr. 5.1* Ověření čistoty frakcí po GST chromatografii pomocí 15% SDS-PAGE. V první jamce je standard molekulových hmotností, označený st. Jako standard byl použit Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Bio-Rad). V jamkách A1-A3 jsou jednotlivé frakce (1-3) jímáné při GST chromatografii na jedné koloně, v jamkách B1-B3 jsou frakce (1-3) jímáné na druhé koloně. V jamce označené jako sonikát je zředěný buněčný lyzát, v jamce označené jako peleta je zředěná buněčná frakce.

### 5.1.1.3 Dialýza a odštěpení GST kotvy

Po GST chromatografii byly pro dialýzu použity dvě dialyzační membrány, do jedné dialyzační membrány byly sloučeny frakce A1-A3, do druhé frakce B1-B3. Dialýza probíhala přes noc ve 2 l pufru pro dialýzu (složení viz tab. 4.6, str. 32). Byla použita dialyzační membrána propouštějící molekuly s  $M_r$  do 6-8 kDa. Pro odštěpení GST kotvy bylo do každé dialyzační membrány přidáno 300  $\mu$ l roztoku PreScission proteasy. Po dialýze byl roztok z obou membrán sloučen a analyzován pomocí 15% SDS-PAGE, gel je uveden na obr. 5.2, str. 55.

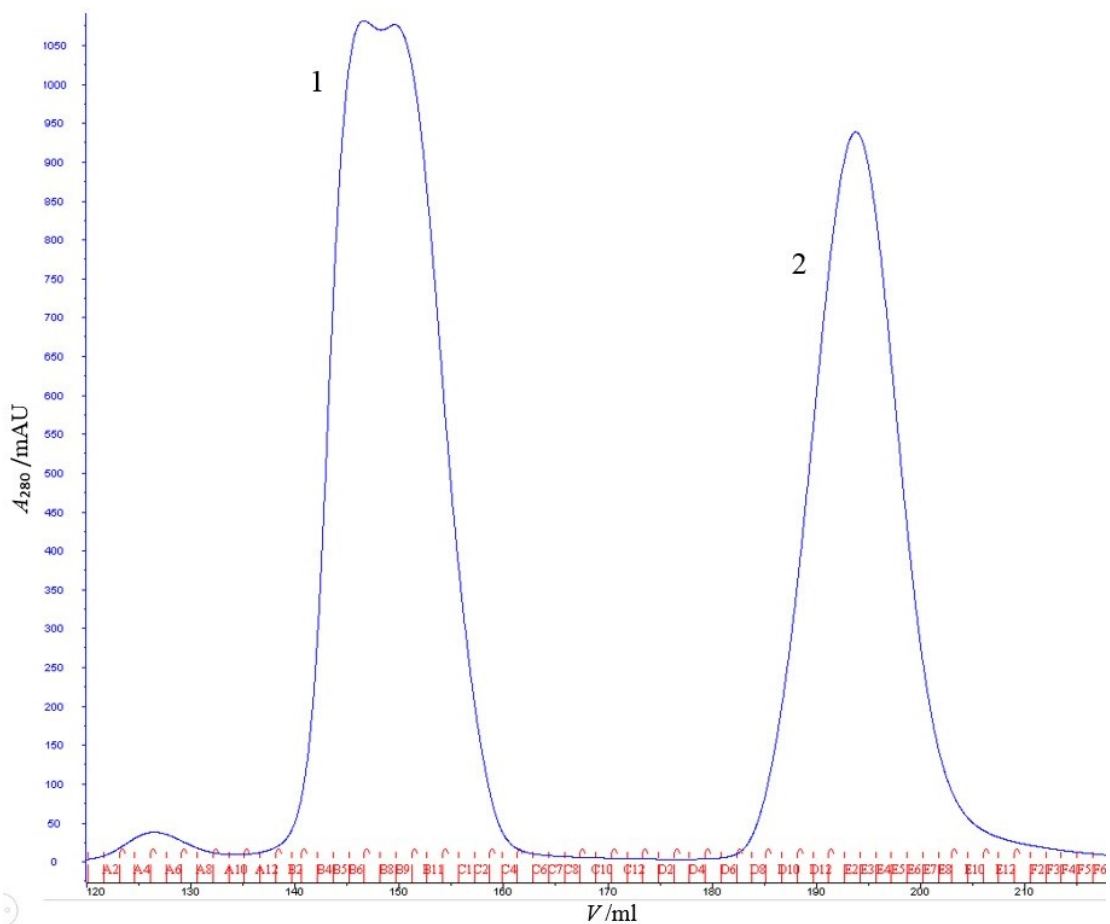


Obr. 5.2 Ověření čistoty proteinového preparátu po dialýze a odštěpení GST kotvy pomocí 15% SDS-PAGE. V první jamce je standard molekulových hmotností, označený st. Jako standard byl použit Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Bio-Rad). V jamkách označených jako před štěpením je vzorek odebraný před dialýzou a štěpením, v jamce označené jako po štěpení je vzorek odebraný po dialýze a odštěpení GST kotvy ( $M_r = 26\ 413$ ).

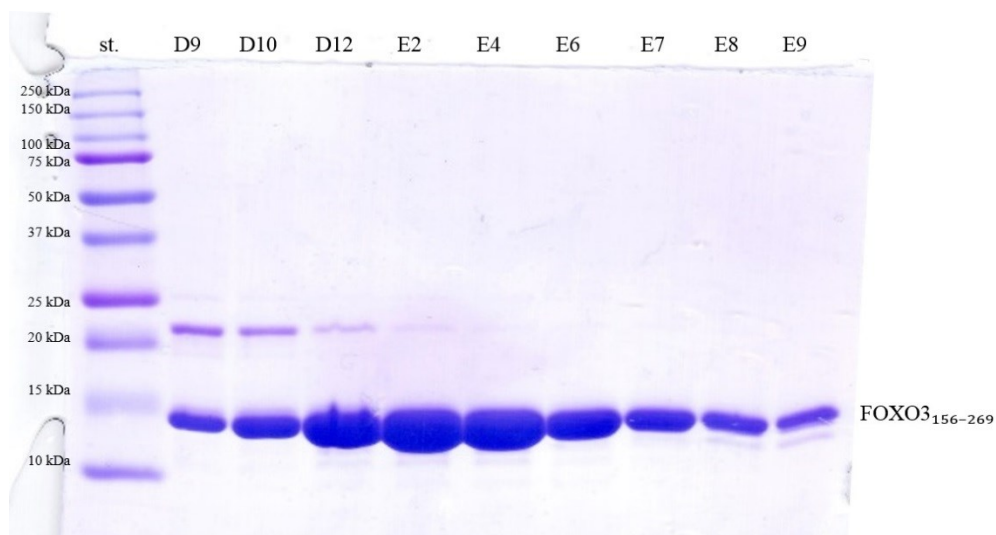
Z gelu na obr. 5.2 je vidět, že došlo ke kvantitativnímu odštěpení GST afinitní kotvy.

#### 5.1.1.4 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie byla provedena podle postupu uvedeném v oddílu 4.3.1.6, str. 33. Objem dávkovaný na kolonu byl cca 1,7 ml, jako mobilní fáze byl použit pufr pro gelovou permeační chromatografii (složení viz tab. 4.8, str. 34). Byla použita kolona HiLoad™ 26/600 Superdex™ 75 pg s rychlostí průtoku mobilní fáze 2 ml/min, objem frakce byl 1,5 ml. Grafický záznam chromatografie, chromatogram, je uveden na obr. 5.3, str. 56. Čistota frakcí obsahujících protein FOXO3<sub>156-269</sub> byla ověřena pomocí 15% SDS-PAGE, gel s analyzovanými frakcemi je uveden na obr. 5.4, str. 56.



Obr. 5.3 Chromatogram z gelové permeační chromatografie FOXO3<sub>156-269</sub> po odštěpení GST afinitní kotvy. Chromatogram představuje závislost absorbance při 280 nm na objemu mobilní fáze. Pík označený číslem 1 odpovídá GST kotvě ( $M_r = 26\ 413$ ), pík označený číslem 2 odpovídá proteinu FOXO3<sub>156-269</sub> ( $M_r = 13\ 348$ ).



Obr. 5.4 Ověření čistoty frakcí po gelové permeační chromatografii pomocí 15% SDS-PAGE. V první jamce je standard molekulových hmotností, označený st. Jako standard byl použit Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Bio-Rad). V jamkách D9-E9 jsou jednotlivé frakce po gelové permeační chromatografii.



Po gelové permeační chromatografii byly sloučeny frakce D11-E7. Z gelu na obr. 5.4, str. 56 je vidět, že získané frakce obsahují převážně protein FOXO3<sub>156-269</sub>. Na gelu jsou patrné nečistoty s vyšší i nižší molekulovou hmotností, než je molekulová hmotnost FOXO3<sub>156-269</sub>. Nečistoty s nižší molekulovou hmotností jsou produkty proteolytické degradace proteinu FOXO3<sub>156-259</sub>. Obsah nečistot ve sloučených frakcích je minoritní.

### 5.1.2 Stanovení koncentrace neznačeného proteinu FOXO3<sub>156-269</sub> a výtěžek purifikace

Koncentrace neznačeného proteinu FOXO3<sub>156-269</sub> byla stanovena spektrofotometricky. Absorbance výsledného preparátu při 280 nm byla změřena 3×, průměrná hodnota absorbance byla  $\bar{A}_{280} = 0,35$ . Pro výpočet koncentrace byl použit vztah (3):

$$c = \frac{0,35}{33460 \cdot 0,1} = 1,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3} \approx 1,4 \text{ mg ml}^{-1}.$$

Celkový objem výsledného preparátu byl 13 ml, výtěžek preparace byl vypočten podle vztahu (4):

$$m = 13 \cdot 10^{-3} \cdot 1,1 \cdot 10^{-4} \cdot 13348 = 19 \text{ mg}.$$

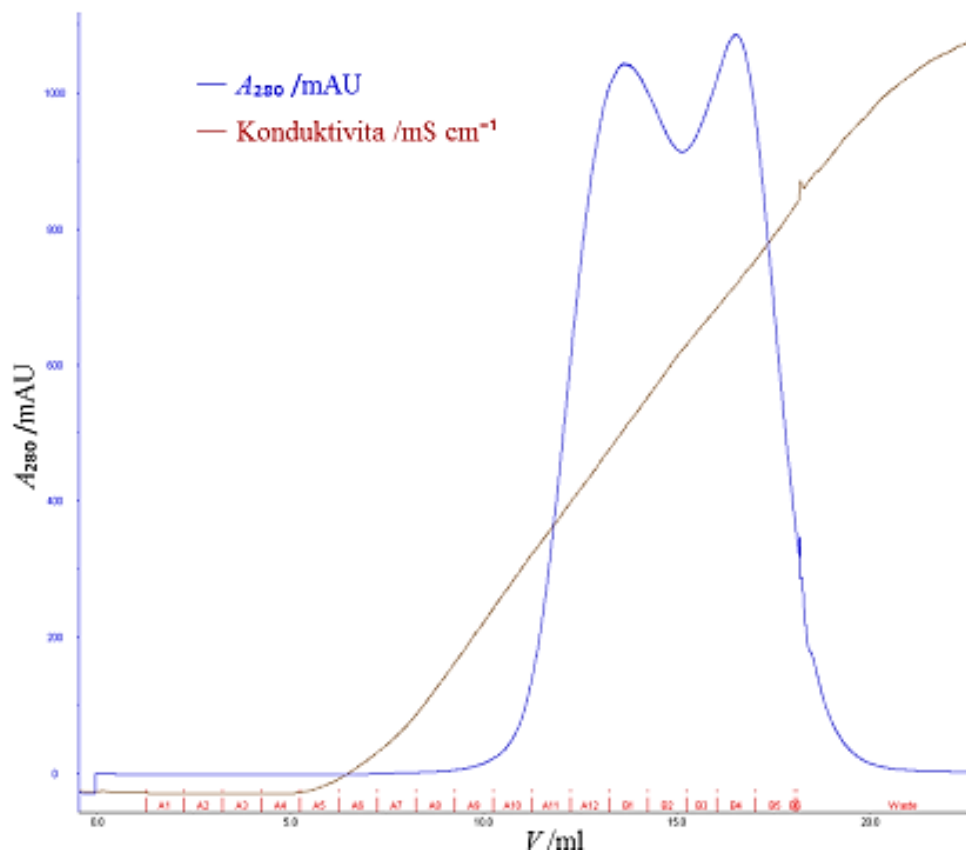
Výtěžek preparace byl 19 mg proteinu FOXO3<sub>156-269</sub> o koncentraci  $1,1 \cdot 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> exprimovaného v 6 l LB média (složení viz tab. 4.1, str. 29) o dostačující čistotě, jedná se o standardní výtěžek proteinu FOXO3<sub>156-269</sub> z 6 l LB média. Toto množství bylo postačující pro experimenty v této práci.

### 5.1.3 Purifikace neznačeného proteinu FOXO3<sub>156-269</sub> s krokem kationtově-výměnné chromatografie

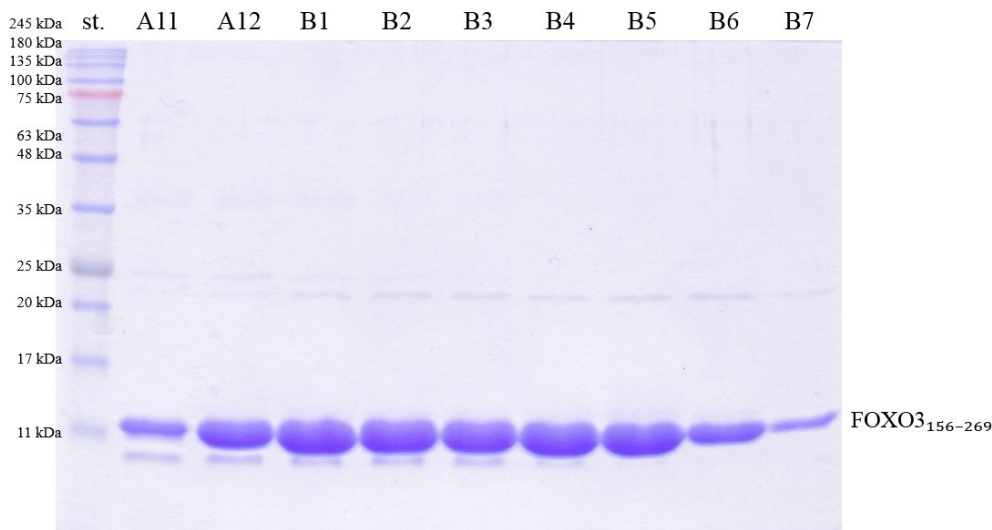
Protein FOXO3<sub>156-269</sub> purifikovaný se zahrnutím kroku kationtově-výměnné chromatografie byl exprimován v buňkách *E. coli* ve 3 l LB média po dobu 12 hodin při 20 °C. Lyze buněk a GST chromatografie byly provedeny podle postupu v oddílech 4.3.1.2, str. 29 a 4.3.1.3, str. 30. Dialýza do pufru pro dialýzu (složení viz tab. 4.6, str. 32) probíhala po dobu 6 hodin při 4 °C, dialýza do pufru pro kationtově-výměnnou chromatografii (složení viz tab. 4.7, str. 32) po dobu 8 hodin při 4 °C.

### 5.1.3.1 Kationtově-výměnná chromatografie

Kationtově-výměnná chromatografie byla provedena podle postupu v oddílu 4.3.1.5, str. 33. Byla použita kolona Mono S<sup>®</sup> 5/50 GL naplněná SP sepharosou, protein byl eluován gradientem koncentrace NaCl ( $c_i(\text{NaCl}) = 0 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c_f(\text{NaCl}) = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $t = 15 \text{ min}$ ) s průtokem mobilní fáze 1 ml/min, objem frakce byl 1 ml. Chromatogram z kationtově-výměnné chromatografie je uveden na obr. 5.5. Frakce byly následně analyzovány pomocí 15% SDS-PAGE, gel je na obr. 5.6, str. 59. Pro další krok, tj. gelovou chromatografií, byly sloučeny frakce A11-B6.



Obr. 5.5 Chromatogram z kationtově-výměnné chromatografie FOXO3<sub>156-269</sub> proteinu po odštěpení GST afinitní kotvy. Chromatogram představuje graf závislosti absorpance při 280 nm na objemu mobilní fáze.



Obr. 5.6 Ověření čistoty frakcí po kationtově-výměnné chromatografii pomocí 15% SDS-PAGE. V první jamce je standard molekulových hmotností, označený st. Jako standard byl použit Blue Protein Ladder (Biosystems). V jamkách A11-B7 jsou jednotlivé jímáné frakce.

Výtěžek purifikace proteinu FOXO3<sub>156-269</sub> s krokem kationtově-výměnné chromatografie byl 7,9 mg proteinu z 3 l LB média, koncentrace proteinu byla  $c = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ , jedná se o standardní výtěžek FOXO3<sub>156-269</sub> proteinu z 3 l LB média.

Krok kationtově-výměnné chromatografie nepřispěl ke zvýšení čistoty proteinového preparátu, a proto byl při následujících purifikacích vynechán.

## 5.2 Exprese a purifikace <sup>15</sup>N značeného proteinu FOXO3<sub>156-269</sub>

### 5.2.1 Exprese <sup>15</sup>N značeného FOXO3<sub>156-269</sub>

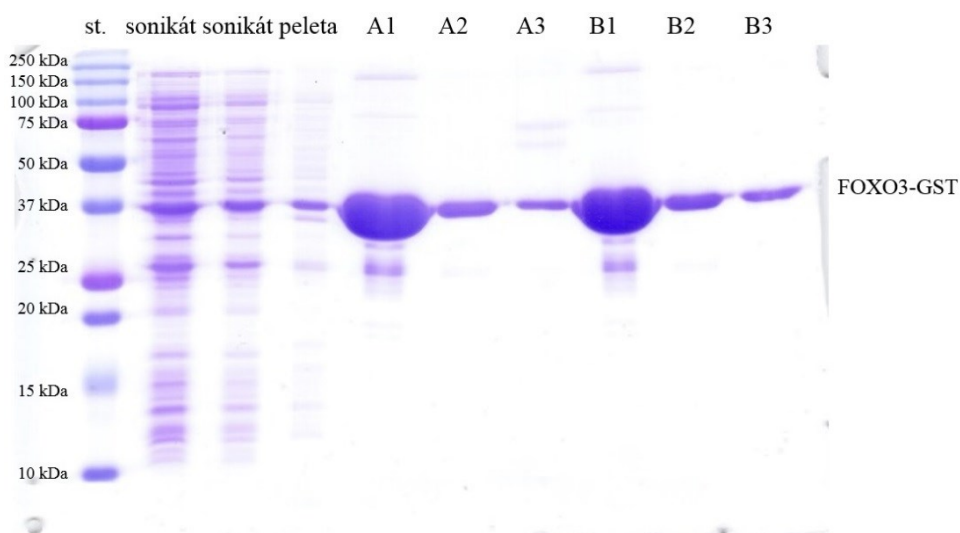
Expresa <sup>15</sup>N značeného proteinu FOXO3<sub>156-269</sub> probíhala v buňkách *E. coli*, kmen BL21(DE3) při teplotě 20 °C po dobu 12 hodin, kolonie byly pěstovány v 8 l obohaceného minimálního média s <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl jako jediným zdrojem dusíku (příprava a složení viz oddíl 4.3.4, str. 38-40). <sup>15</sup>N značený protein FOXO3<sub>156-269</sub> je exprimován jako fúzní protein s GST kotvou na N-konci.

## 5.2.2 Purifikace <sup>15</sup>N značeného FOXO3<sub>156-269</sub>

Purifikace značeného proteinu sestává ze tří hlavních kroků: GST afinitní chromatografie, dialýzy a odštěpení GST kotvy a gelové permeační chromatografie.

### 5.2.2.1 GST chromatografie

GST chromatografie byla provedena podle postupu uvedeného v oddílu 4.3.1.3, str. 30. Při purifikaci značeného proteinu exprimovaného v 8 l obohaceného minimálního média byly provedeny dvě paralelní GST chromatografie (A a B) na dvou kolonách s 5 ml stacionární fáze. Jímáno bylo 2×6 frakcí po 10 ml, čistota frakcí byla analyzována pomocí 15% SDS-PAGE, gel s analyzovanými frakcemi je uveden na obr. 5.7. Pro dialýzu a štěpení GST kotvy byly sloučeny frakce A1-A3 a B1-B3.

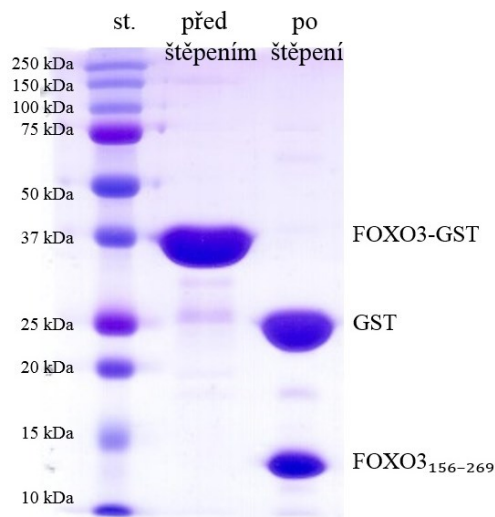


Obr. 5.7 Ověření čistoty frakcí po GST chromatografii pomocí 15% SDS-PAGE. V první jamce je standard molekulových hmotností, označený st. Jako standard byl použit Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Bio-Rad). V jamkách A1-A3 jsou jednotlivé frakce (1-3) jímáné při GST chromatografii na jedné koloně, v jamkách B1-B3 jsou frakce (1-3) jímáné na druhé koloně. V jamkách označených jako sonikát je 10× a 20× zředěný buněčný lyzát, v jamce označené jako peleta je zředěná buněčná frakce.

### 5.2.2.2 Dialýza a odštěpení GST kotvy

Podle postupu, uvedeného v oddílu 4.3.1.4, str. 32, byly provedeny dvě paralelní dialýzy, každá ve 2 l pufru pro dialýzu (složení viz tab. 4.6, str. 32) s použitím dialyzační membrány propouštějící molekuly s  $M_r$  do 6-8 kDa. Do jedné dialyzační membrány byly

sloučeny frakce A1-A3, do druhé byly sloučeny frakce B1-B3. Do každé dialyzační membrány bylo přidáno 400  $\mu$ l roztoku PreScission proteasy. Po dialýze byly roztoky z obou membrán sloučeny, výsledný roztok byl analyzován pomocí 15% SDS-PAGE, gel je uveden na obr. 5.8.



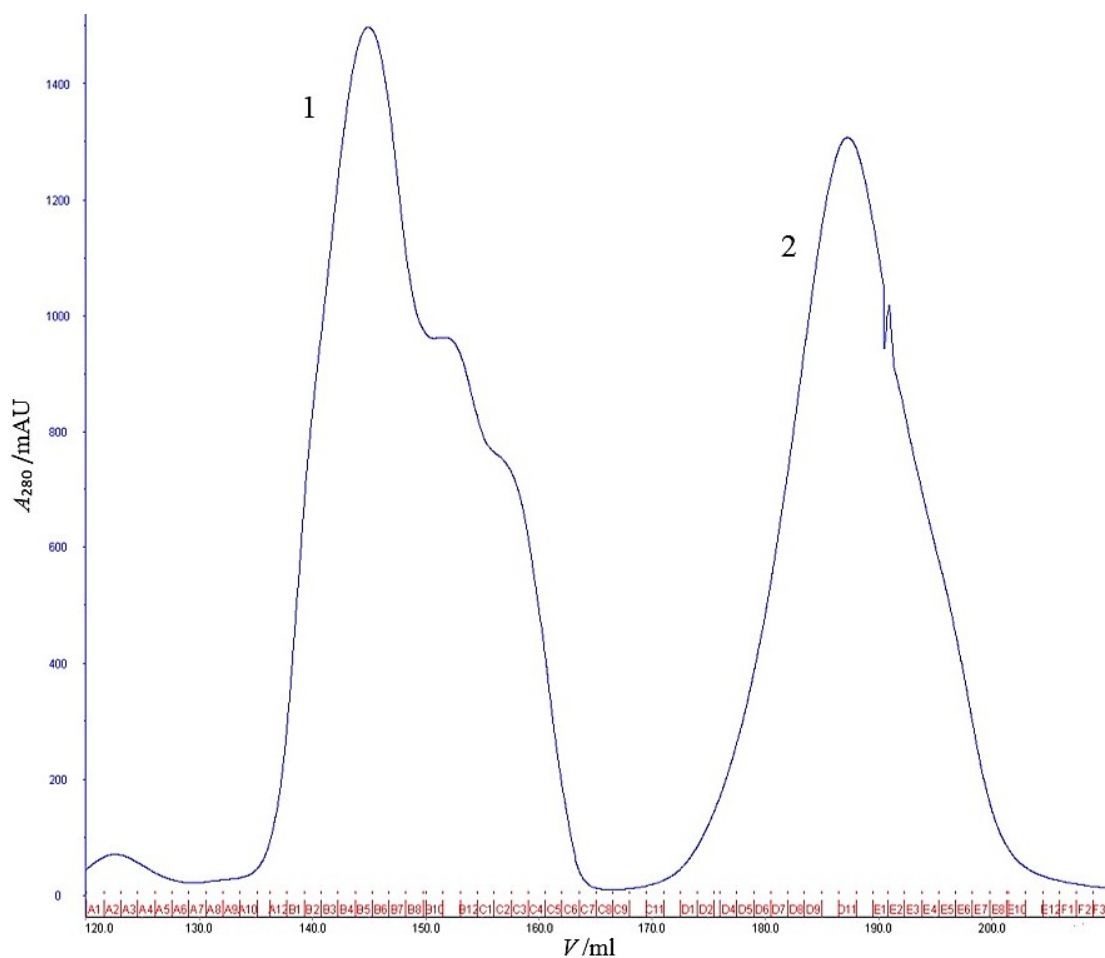
Obr. 5.8 Ověření čistoty proteinového preparátu po dialýze a odštěpení GST kotvy pomocí 15% SDS-PAGE. V první jamce je standard molekulových hmotností, označený st. Jako standard byl použit Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Bio-Rad). V jamce označené jako před štěpením je vzorek odebraný před dialýzou a štěpením, v jamce označené jako po štěpení je vzorek odebraný po dialýze a odštěpení GST kotvy ( $M_r = 26\ 413$ ).

Z gelu na obr. 5.8 je vidět, že došlo k úplnému odštěpení GST afinitní kotvy.

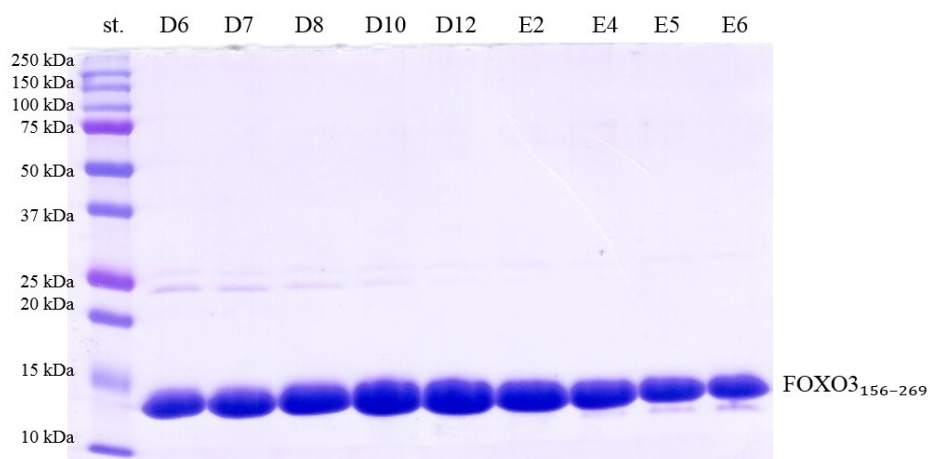
### 5.2.2.3 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie byla provedena podle postupu uvedeném v oddílu 4.3.1.6, str. 33. Objem dávkovaný na kolonu byl cca 2 ml, jako mobilní fáze byl použit pufr pro gelovou permeační chromatografii (složení viz tab. 4.8, str. 34). Byla použita kolona HiLoad™ 26/600 Superdex™ 75 pg s rychlostí průtoku mobilní fáze 2 ml/min, objem frakce byl 1,5 ml. Chromatogram je znázorněn na obr. 5.9, str. 62. Čistota frakcí obsahujících protein byla ověřena pomocí 15% SDS-PAGE, gel je na obr. 5.10, str. 62)

Po gelové permeační chromatografii byly sloučeny frakce D6-E5. Z gelu na obr. 5.10, str. 62 je vidět, že frakce obsahují převážně protein FOXO3<sub>156-269</sub>. Na gelu jsou patrné nečistoty s vyšší i nižší molekulovou hmotností, než je molekulová hmotnost FOXO3<sub>156-269</sub>. Nečistoty s nižší molekulovou hmotností jsou produkty proteolytické degradace proteinu FOXO3<sub>156-259</sub>. Obsah nečistot ve sloučených frakcích je minoritní.



Obr. 5.9 Chromatogram z gelové permeační chromatografie  $^{15}\text{N}$  značeného FOXO3<sub>156-269</sub> po odštěpení GST afinitní kotvy. Chromatogram představuje graf závislosti absorbance při 280 nm na objemu mobilní fáze. Pík označený číslem 1 odpovídá GST kotvě ( $M_r = 26\,413$ ), pík označený číslem 2 odpovídá proteinu FOXO3<sub>156-269</sub> ( $M_r = 13\,348$ ).



Obr. 5.10 Ověření čistoty frakcí po gelové permeační chromatografii pomocí 15% SDS-PAGE. V první jamce je standard molekulových hmotností, označený st. Jako standard byl použit Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Bio-Rad). V jamkách D9-E9 jsou jednotlivé frakce po gelové permeační chromatografii.

### 5.2.3 Stanovení koncentrace $^{15}\text{N}$ značeného proteinu FOXO3<sub>156-269</sub> a výtěžek purifikace

Koncentrace  $^{15}\text{N}$  značeného proteinu FOXO3<sub>156-269</sub> byla stanovena spektrofotometricky. Absorbance výsledného preparátu při 280 nm byla změřena 3×, průměrná hodnota absorbance byla  $\bar{A}_{280} = 5,0$ . Pro výpočet koncentrace byl použit vztah (3):

$$c = \frac{5,0}{33460 \cdot 1} = 1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3} \approx 2,0 \text{ mg ml}^{-1}.$$

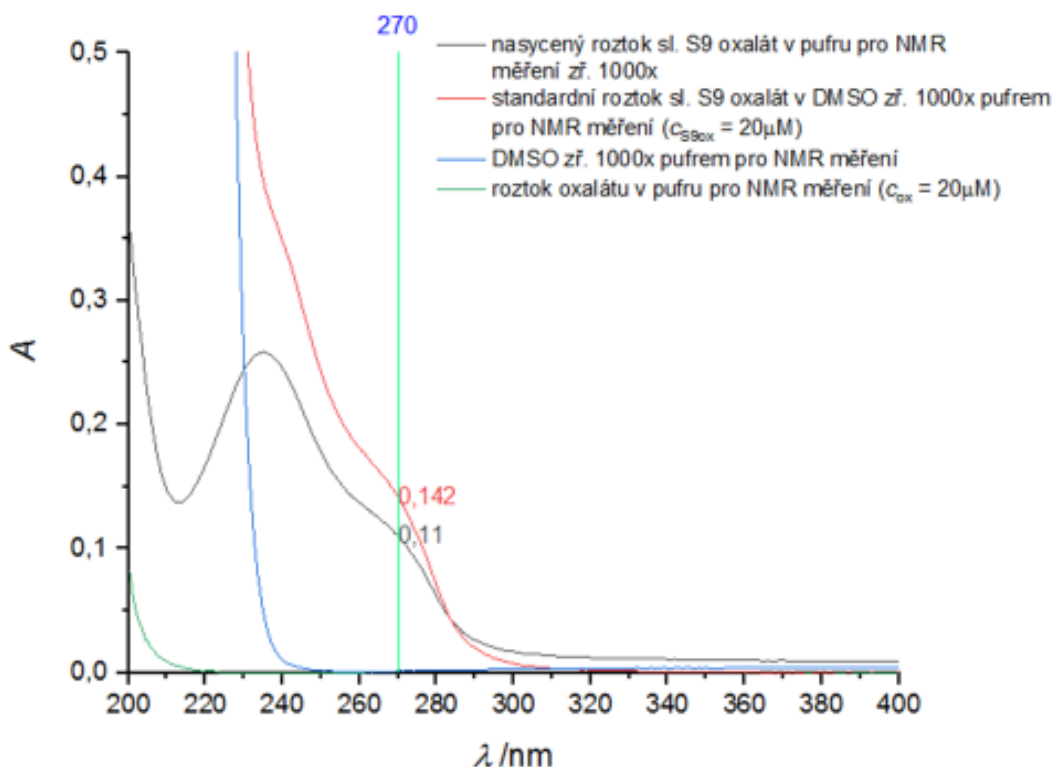
Celkový objem výsledného preparátu byl 18 ml, výtěžek preparace byl vypočten podle vztahu (4):

$$m = 18 \cdot 10^{-3} \cdot 1,5 \cdot 10^{-4} \cdot 13348 = 36 \text{ mg}.$$

Výtěžek preparace byl 36 mg proteinu FOXO3<sub>156-269</sub> o koncentraci  $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  exprimovaného v 8 l obohaceného minimálního média (složení viz oddíl 4.3.4, str. 38-40) o dostačující čistotě, jedná se o poměrně vysoký výtěžek  $^{15}\text{N}$  značeného FOXO3<sub>156-269</sub> proteinu z 8 l obohaceného minimálního média.

## 5.3 Odhad koncentrace nasyceného roztoku sloučeniny S9 oxalát v pufru pro NMR měření

Pro další experimenty bylo nutné odhadnout koncentraci nasyceného roztoku sl. S9 oxalát v pufru pro NMR měření (složení viz tab. 4.27, str. 48). Pro odhad koncentrace sloučeniny S9 oxalát byla zvolena metoda jednobodové kalibrace. Absorpční spektrum zředěného roztoku standardu je ovlivněno přítomností DMSO (viz obr. 5.11, str. 64), proto nemohla být pro výpočet koncentrace použita vlnová délka odpovídající absorpčnímu maximu sloučeniny S9 oxalát (235 nm), kdy je výpočet nejpřesnější. Místo vlnové délky odpovídající absorpčnímu maximu byla zvolena vlnová délka 270 nm, při které neabsorbují v roztoku přítomný DMSO (viz obr. 5.11, str. 64).



Obr. 5.11 Absorpční spektrum zředěného roztoku standardu (v DMSO) a zředěného nasyceného roztoku sloučeniny S9 oxalát. Absorpční spektra představují závislost absorbance na vlnové délce, absorpční spektrum nasyceného roztoku sl. S9 oxalát v pufru pro NMR měření reprezentuje černá křivka, zředěný roztok standardu křivka červená. Vlnová délka 270 nm, při které byl proveden výpočet koncentrace, je vyznačena zelenou svislou čarou. V grafu jsou uvedena i absorpční spektra samotného DMSO a samotného oxalátu (viz legenda). Je vidět, že jak samotný DMSO, tak samotný oxalát neabsorbují záření o vlnové délce 270 nm.

Absorbance zředěného roztoku standardu při 270 nm byla  $A_{270} = 0,142$ , absorbance 1000x zředěného nasyceného roztoku sloučeniny S9 oxalát byla  $A_{270} = 0,110$ . Pro výpočet koncentrace nasyceného roztoku byl použit vztah (5).

$$c = \frac{0,110 \cdot 20 \cdot 10^{-3}}{0,142} = 15 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$$

## 5.4 EMSA

Schopnost sloučeniny S9 oxalát inhibovat vazbu FOXO3 DBD s DNA se specificky rozpoznávaným motivem IRE byla ověřena pomocí analýzy elektroforetické mobility, EMSA. Provedeny byly dva experimenty. V prvním experimentu byl ověřen inhibiční efekt sloučeniny S9 oxalát na vazbu FOXO3 DBD s DNA-IRE. Sloučenina S9 oxalát je solí kyseliny šťavelové, je tedy slabým elektrolytem, který ve vodném prostředí



do určité míry disociuje. V roztoku tak bude přítomno určité rovnovážné množství volného oxalátu. Aby byl vyloučen fakt, že inhibiční efekt na vazbu FOXO3 DBD a DNA je způsoben samotným oxalátem, byl proveden druhý, kontrolní, experiment. V kontrolním, experimentu byl porovnán inhibiční efekt sloučeniny S9 oxalát na vazbu FOXO3 a DNA-IRE s inhibičním efektem samotného oxalátu.

### 5.4.1 Ověření inhibičního efektu S9 oxalátu na vazbu FOXO3 s DNA pomocí EMSA

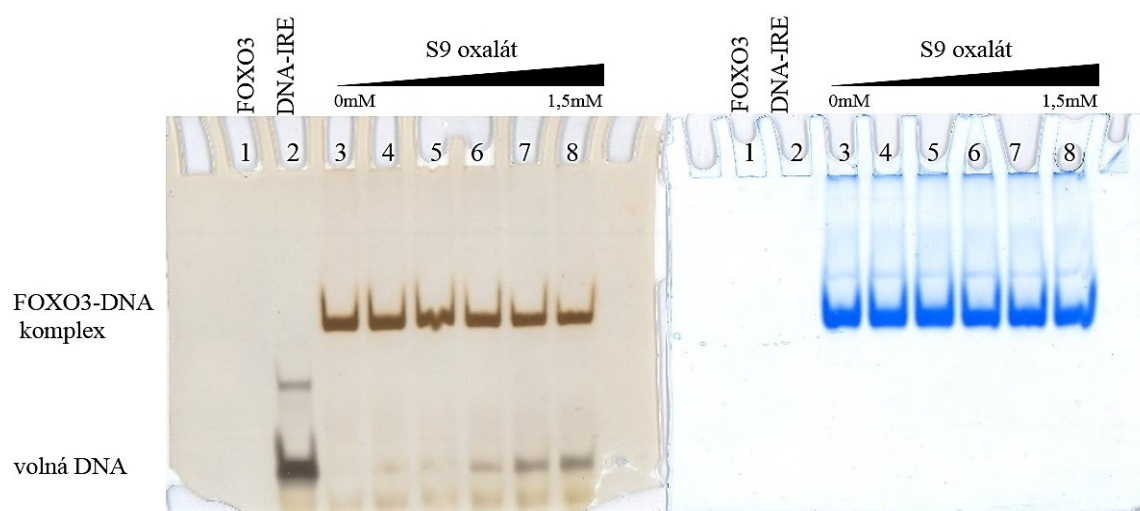
Vzorky pro byly připraveny podle postupu uvedeném v oddílu 4.3.7, str. 43. Složení vzorků pro nativní elektroforézu je uvedeno v tab. 5.1.

Tab. 5.1 Složení vzorků pro EMSA při ověření inhibičního efektu sloučeniny S9 oxalát

	FOXO3 <sub>156-269</sub> ( <i>c</i> = 387μM)	DNA-IRE ( <i>c</i> = 500μM)	MgCl <sub>2</sub> ( <i>c</i> = 20mM)	S9 oxalát ( <i>c</i> = 3mM)	NMR pufr*	vzorkový pufr
	<i>V</i> /μl					
1	7,00	0	4,00	0	29,0	10,00
2	0	4,00	4,00	0	32,0	10,00
3	7,00	4,00	4,00	0	25,0	10,00
4	7,00	4,00	4,00	5,00	20,00	10,00
5	7,00	4,00	4,00	10,00	15,00	10,00
6	7,00	4,00	4,00	15,00	10,00	10,00
7	7,00	4,00	4,00	20,00	5,00	10,00
8	7,00	4,00	4,00	25,0	0	10,00

\*složení viz tabulka 4.27, str. 48

Na gelu vizualizovaném pomocí stříbrných iontů (viz obr. 5.12, str. 66, vlevo) je vidět, že s přibývajícím koncentrací inhibitoru S9 oxalát vzrůstá koncentrace volné, nevázané DNA obsahující IRE motiv, což značí, že sloučenina S9 oxalát je schopna inhibovat vazbu FOXO3 DBD s DNA. Na kontrolním gelu barveném pomocí Coomassie (viz obr. 5.12, str. 66, vpravo) se zároveň potvrdilo, že vzorky 3-8 obsahovaly stejné množství proteinu.



Obr. 5.12 12% polyakrylamidové gely pro nativní elektroforézu. Gel nalevo je barven pomocí stříbrných iontů (viz oddíl 4.3.7, str. 43-44), kdy je vizualizována pouze DNA, gel napravo je barven pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250 (viz oddíl 4.3.2, str. 35), vizualizován je protein. Čísla jamek odpovídají číslům vzorků v tab. 5.1 (str. 65). Do jamky 1 byl nanesen samotný protein FOXO3, který při nativní elektroforéze neputuje gelem (viz oddíl 4.3.7, str. 43), v jamce 2 je samotná DNA-IRE (sekvence viz oddíl 4.3.6, str. 42). V jamkách 3-8 roste koncentrace sloučeniny S9 oxalát od 0mM do 1,5mM. S rostoucí koncentrací S9 oxalátu se v dolní části gelu nalevo objevuje volná DNA-IRE.

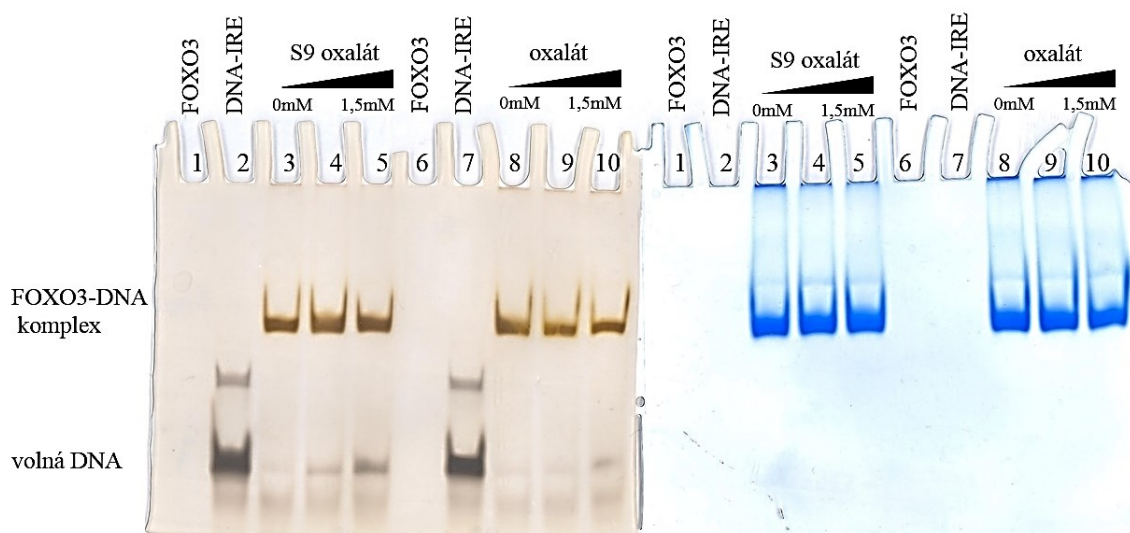
## 5.4.2 Porovnání inhibičního efektu S9 oxalátu a samotného oxalátu na vazbu FOXO3 a DNA – kontrolní experiment

Vzorky pro byly připraveny podle postupu uvedeném v oddílu 4.3.7, str. 43. Složení vzorků pro nativní elektroforézu je uvedeno v tab. 5.2.

Tab. 5.2 Složení vzorků pro EMSA, kontrolní experiment

	FOXO3 <sub>156-269</sub> ( <i>c</i> = 387μM)	DNA-IRE ( <i>c</i> = 500μM)	MgCl <sub>2</sub> ( <i>c</i> = 20mM)	S9 oxalát ( <i>c</i> = 3mM)	oxalát ( <i>c</i> = 3mM)	NMR pufr*	vzorkový pufr
	<i>V</i> / μl						
1	7,00	0	4,00	0	0	29,0	10,00
2	0	4,00	4,00	0	0	32,0	10,00
3	7,00	4,00	4,00	0	0	25,0	10,00
4	7,00	4,00	4,00	15,00	0	10,00	10,00
5	7,00	4,00	4,00	25,0	0	0	10,00
6	7,00	0	4,00	0	0	29,0	10,00
7	0	4,00	4,00	0	0	32,0	10,00
8	7,00	4,00	4,00	0	0	25,0	10,00
9	7,00	4,00	4,00	0	15,00	10,00	10,00
10	7,00	4,00	4,00	0	25,0	0	10,00

\*složení viz tabulka 4.27, str. 48



Obr. 5.13 12% polyakrylamidové gely pro nativní elektroforézu. Gel nalevo je barven pomocí stříbrných iontů (viz oddíl 4.3.7, str. 43-44), kdy je vizualizována pouze DNA, gel napravo je barven pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250 (viz oddíl 4.3.2, str. 35), vizualizován je protein. Čísla jamek odpovídají číslům vzorků v tab. 5.2 (str. 66). Do jamek 1 a 6 byl nanesen samotný protein FOXO3<sub>156-269</sub>, který při nativní elektroforéze neputuje gelem (viz oddíl 4.3.7, str. 43), v jamkách 2 a 7 je samotná DNA-IRE (sekvence viz oddíl 4.3.6, str. 42). V jamkách 3-5 roste koncentrace S9 oxalátu od 0mM do 1,5mM, v jamkách 8-10 roste koncentrace samotného oxalátu od 0mM do 1,5mM. S rostoucí koncentrací S9 oxalátu (jamky 3-5) i samotného oxalátu (jamky 8-10) se v dolní části gelu nalevo objevuje volná DNA-IRE.

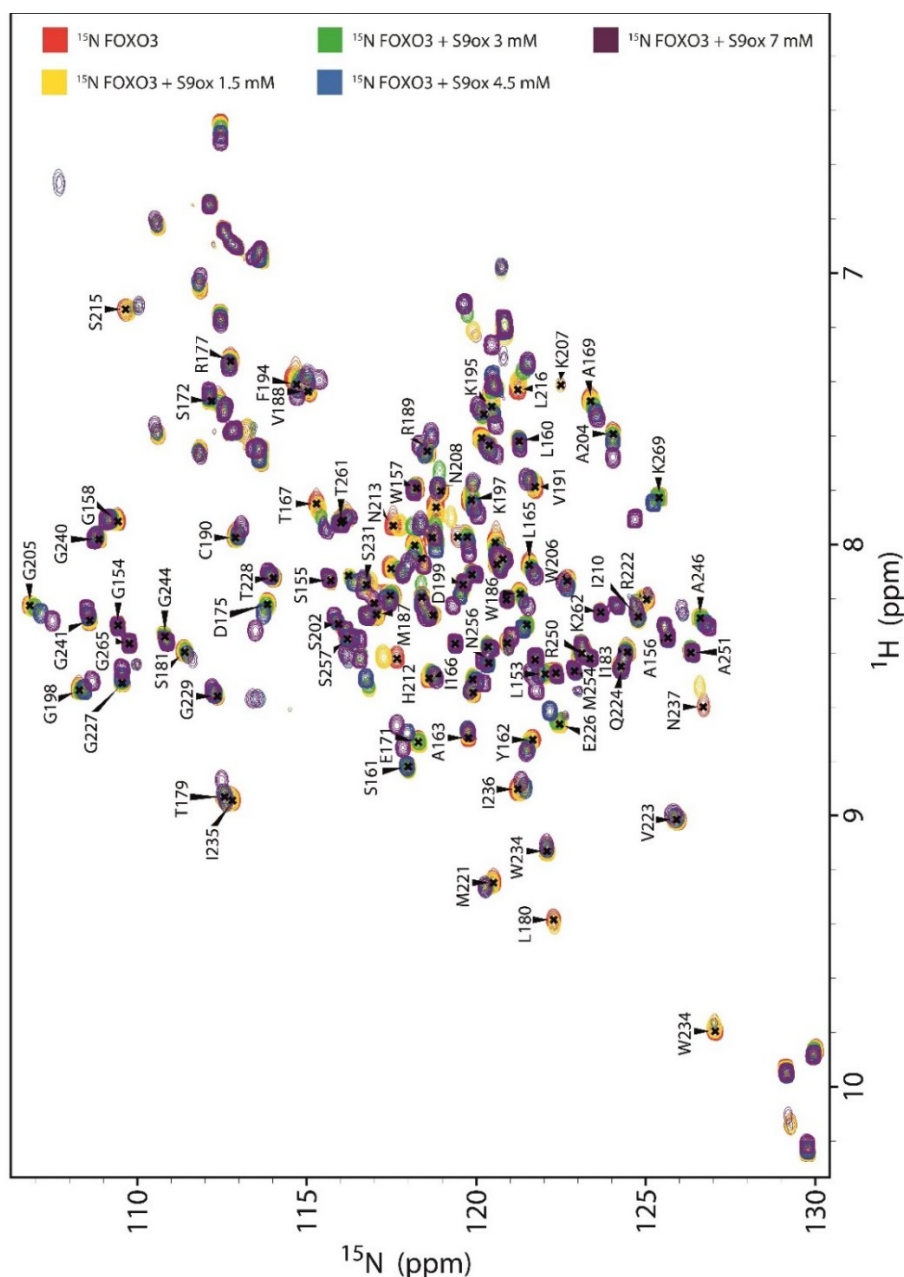
Na gelu nalevo barveném pomocí stříbrných iontů (obr. 5.13 vlevo) je vidět, že s přibývajícím koncentrací sloučeniny S9 oxalát přibývá koncentrace volné, nevázané DNA, to samé však platí pro samotný oxalát. Porovnáním koncentrace volné DNA v jamkách 5 (1,5mM S9 oxalát) a 10 (1,5mM oxalát) je vidět, že inhibiční efekt sloučeniny S9 oxalát je silnější než inhibiční efekt samotného oxalátu. Kontrolní gel barvený pomocí Coomassie (viz obr. 5.13, vpravo) ukázal, že vzorky 3-5 a 8-10 obsahovaly stejné množství proteinu.

Výsledky EMSA potvrdily, že sloučenina S9 oxalát je schopna inhibovat interakci FOXO3 DBD a DNA s IRE motivem, inhibiční efekt je však poměrně slabý pravděpodobně v důsledku nízké vazebné afinity sloučeniny S9 oxalát.

## 5.5 NMR experimenty

### 5.5.1 2D $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC experiment

Při titraci FOXO3-DBD roztokem sloučeniny S9 oxalát byla pozorována rychlá výměna mezi volnou a vázanou formou ligandu (resp. proteinu) s postupným posunem některých signálů v závislosti na koncentraci ligandu (viz obr. 5.14).



Obr. 5.14  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  korelační spektra, série 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC experimentů pro různé koncentrace sloučeniny S9 oxalát (titrace ligandem). Každá barva odpovídá jednomu 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC experimentu s určitou koncentrací sloučeniny S9 oxalát ve vzorku. Obrázek vytvořila RNDr. Katarína Pšenáková.

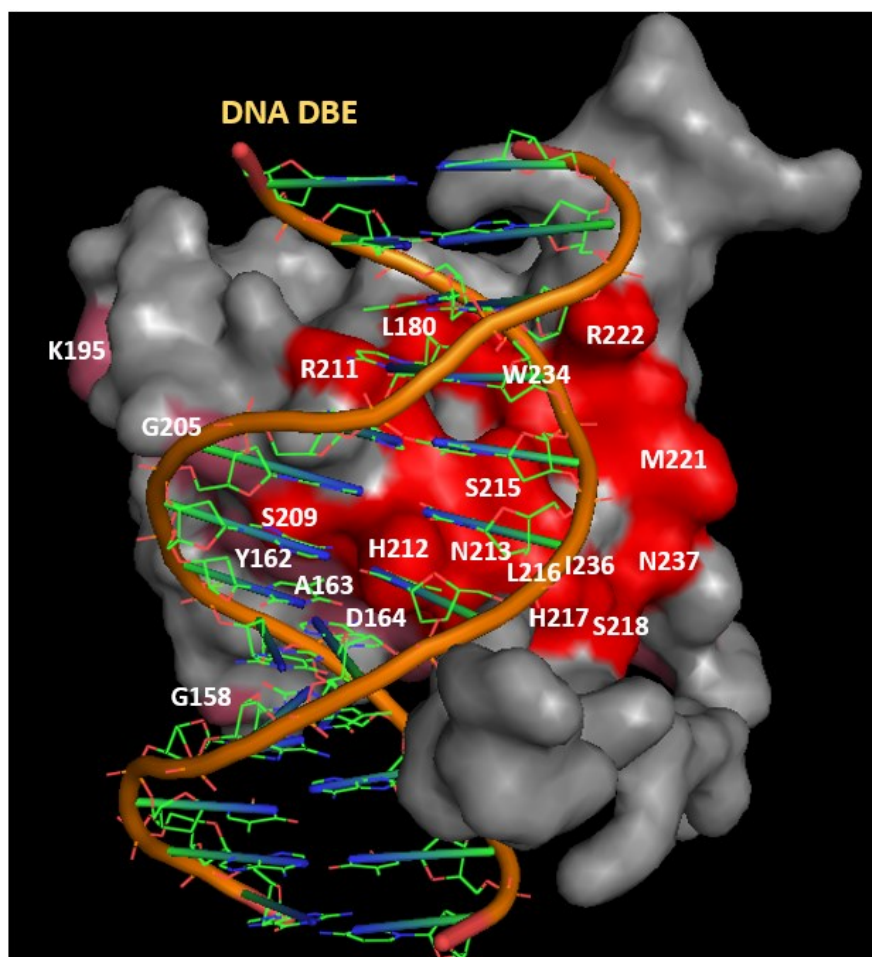
Na obr. 5.14, str. 68, který představuje sérii 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC experimentů, tj. titraci FOXO3<sub>156-269</sub> sloučeninou S9 oxalát je vidět posun krosníků v závislosti na koncentraci sloučeniny S9 oxalát. Rezidua, jejichž krosníky odpovídající NH skupinám polypeptidového řetězce jsou posunuty nejvíce, pravděpodobně tvoří vazebný povrch pro sloučeninu S9 oxalát. Rezidua se signifikantní relativní CSP jsou uvedena v tab. 5.3. Relativní CSP byla vyhodnocena pro minimální koncentraci sloučeniny S9 oxalát (žluté spektrum). Vyhodnocení bylo provedeno RNDr. Katarínou Pšenákovou.

Tab. 5.3 Rezidua se signifikantní relativní CSP

reziduum	rel. CSP	reziduum	rel. CSP	reziduum	rel. CSP
■ N237	6,285	■ Y162	1,378	■ M221	0,858
■ H212	6,217	■ G158	1,313	■ W234	0,835
■ N213	3,138	■ I236	1,297	■ G205	0,835
■ R211	2,465	■ R222	1,173	■ F194	0,774
■ L216	2,079	■ V191	1,164	■ K195	0,744
■ T167	1,927	■ D239	1,026	■ M187	0,725
■ S215	1,532	■ A163	0,926	■ H217*	-
■ S209	1,418	■ D164	0,919	■ S218*	-
■ L180	1,383	■ R168	0,914		

Červeně označená rezidua byla na základě 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC experimentu vybrána jako flexibilní při molekulovém dokování, rezidua označená růžově mají signifikantní CSP, ale nebyla vybrána jako flexibilní. Rezidua označená \* byla vybrána jako flexibilní, neboť tvoří s ostatními červeně vyznačenými rezidui celistvý povrch. Vzhledem k tomu, že se nachází ve vysoce flexibilní části proteinového řetězce, pro ně chybí přiřazení píků v 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektru.

Rezidua, která jsou v tab. 5.3 označená červeně byla vybrána jako flexibilní při molekulovém dokování, neboť mají signifikantní CSP a tvoří celistvý povrch, který je potenciálním vazebným povrchem pro sloučeninu S9 oxalát. Rezidua G205, Y162, A163 a D164 jsou sice součástí tohoto povrchu, nicméně nebyla vybrána jako flexibilní pro molekulové dokování z důvodu, že při výpočtu je povoleno pouze 32 aktivních torzí postranních řetězců a "search space" nesmí být větší než 27 000 Å<sup>3</sup>. Navíc byla jako flexibilní vybrána rezidua H217 a S218, tato tvoří s ostatními flexibilními rezidui celistvý povrch, nachází se ale ve vysoce flexibilní části proteinového řetězce, proto pro ně chybí přiřazení krosníků v NMR spektru.

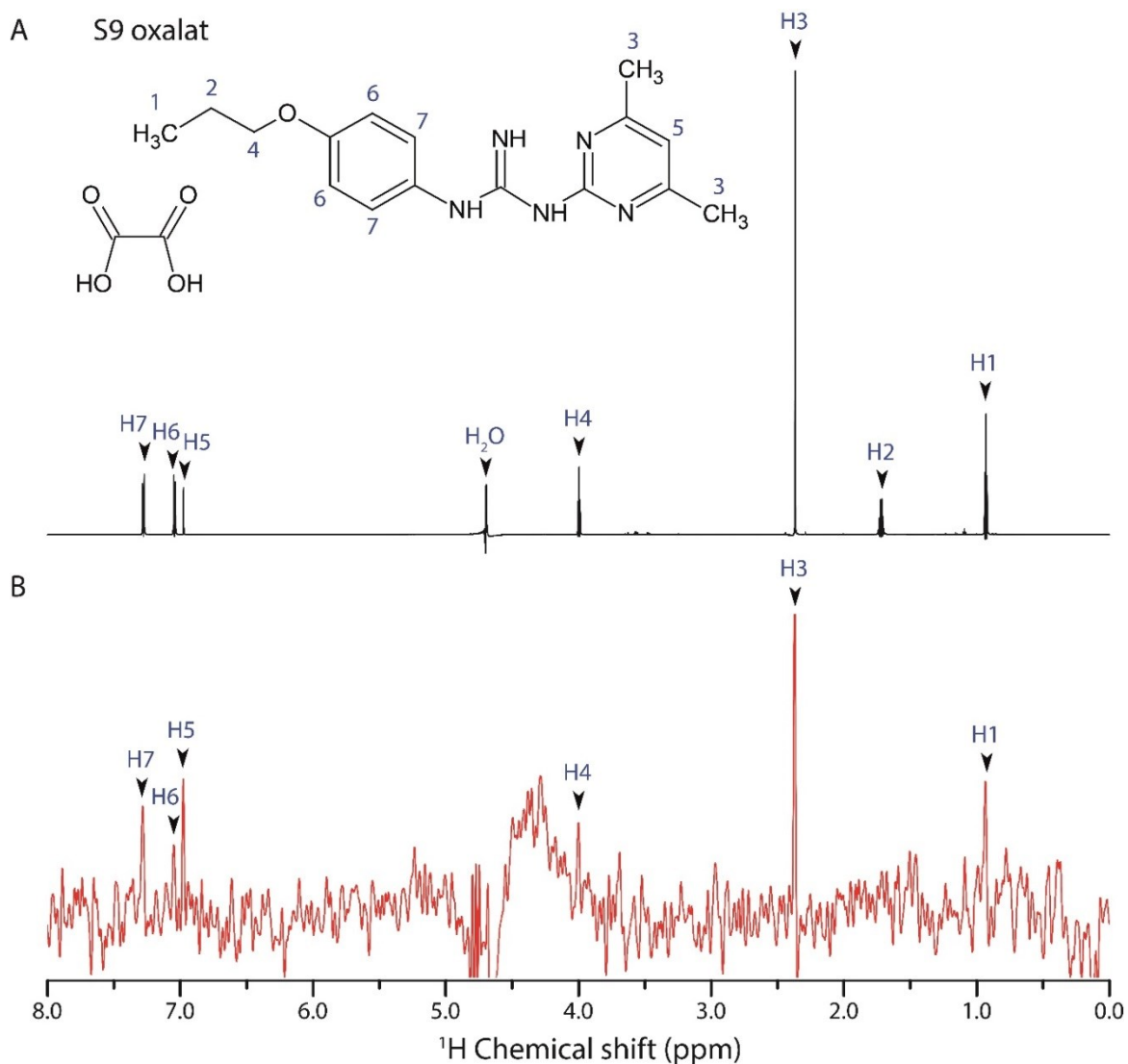


Obr. 5.15 Znárodnění reziduí se signifikantní CSP na krystalové struktuře komplexu FOXO3 DBD s DNA obsahující DBE motiv. Rezidua jsou značena analogicky s tab. 5.3, str. 69. Červený povrch odpovídá povrchu reziduí vybraných na základě vyhodnocení NMR dat jako flexibilní při molekulovém dokování. Růžový povrch odpovídá reziduí, která mají signifikantní CSP, ale nebyla vybrána jako flexibilní při molekulovém dokování. Červeně vyznačený povrch reziduí, vybraných jako flexibilní při molekulovém dokování, zároveň tvoří podstatnou část DNA-vazebného povrchu. Obrázek byl vytvořen v programu The PyMol Molecular Graphics System, v.0.99, Schrödinger, LLC.

Série 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC experimentů (titrace ligandem) pomohla identifikovat, která rezidua FOXO3 DBD jsou nejvíce ovlivněna vazbou sloučeniny S9 oxalát. Na základě vyhodnocení relativní CSP pro nejnižší koncentraci ligandu ( $1,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) byl identifikován vazebný povrch pro sloučeninu S9 oxalát, jeho reprezentace je na obr. 5.15, kde je vidět, že tento vazebný povrch tvoří rovněž podstatnou část DNA-vazebného povrchu.

## 5.5.2 STD experiment

Pro potvrzení přímé interakce FOXO3 DBD se sloučeninou S9 oxalát byl proveden STD experiment, STD spektrum i spektrum samotné sl. S9 oxalát je uvedeno na obr. 5.16.



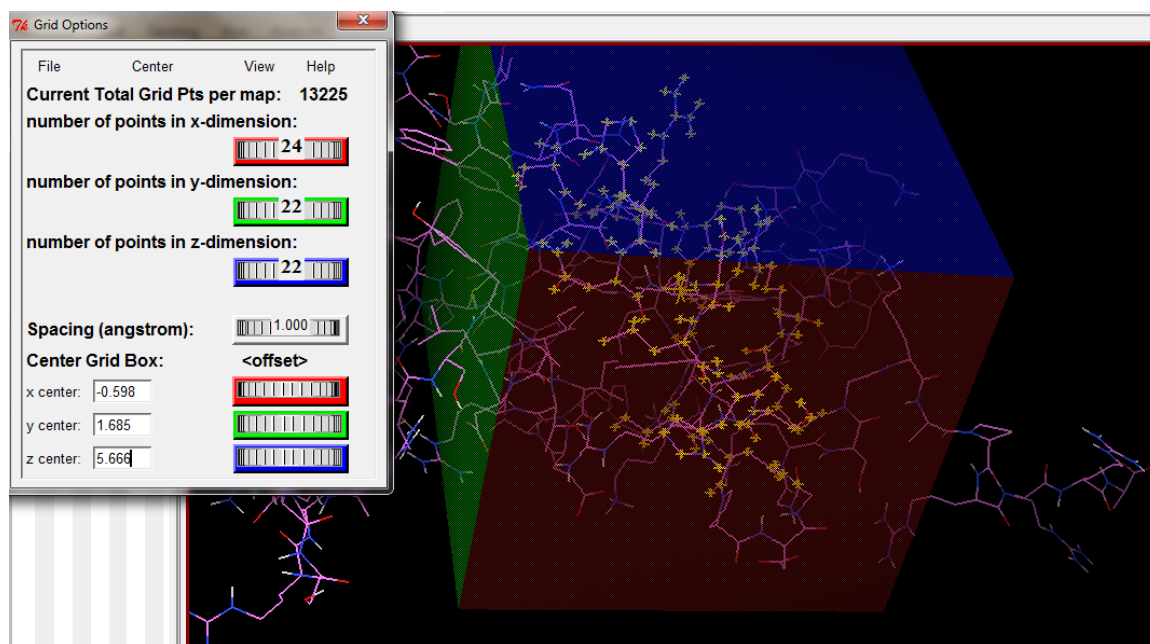
Obr. 5.16 STD NMR experiment. Spektrum A je <sup>1</sup>H spektrum samotné sloučeniny S9 oxalát, spektrum B je <sup>1</sup>H STD spektrum neznačeného proteinu FOXO3<sub>156-269</sub> a sloučeniny S9 oxalát. Symboly H1-H7 jsou přiřazeny jednotlivé signály <sup>1</sup>H jader sloučeniny S9 oxalát, protony označené stejnými čísly jsou chemicky ekvivalentní. Signály <sup>1</sup>H jader guanidinové skupiny sl. S9 oxalát ve spektru chybí, neboť podléhají rychlé výměně s <sup>1</sup>H jádry rozpouštědla. Obrázek vytvořila RNDr. Katarína Pšenáková.

STD NMR experiment ukázal, že některá <sup>1</sup>H jádra sloučeniny S9 oxalát se nachází v přímé blízkosti FOXO3 DBD (viz obr. 5.16), což potvrzuje přímou interakci sloučeniny S9 oxalát a FOXO3 DBD. Jde o <sup>1</sup>H jádra propoxyfenylové skupiny, <sup>1</sup>H jádro

pyrimidinového kruhu a  $^1\text{H}$  jádra methylových skupin pyrimidinového kruhu.  $^1\text{H}$  jádra guanidinové skupiny podléhají rychlé výměně s  $^1\text{H}$  jádry rozpouštědla, jejich signály v 1D  $^1\text{H}$ , a tudíž i STD, spektru chybí.

## 5.6 Molekulové dokování

Za účelem predikce interakcí a vazebné konformace sloučeniny S9 oxalát a FOXO3 DBD bylo provedeno molekulové dokování. Pro dokování se sloučeninou S9 byly na základě vyhodnocení relativní CSP vybrána rezidua, která se pravděpodobně podílí na vazbě ligandu (viz tab. 5.3, str. 69). Tato rezidua byla vybrána jako flexibilní, v programu AutoDockTools v1.5.6 (Morris *et al.*, 2009) byly vytvořeny vstupní soubory pro AutoDock Vina: rigid.pdbqt a flexible.pdbqt. Dále byl specifikován tzv. search space, jehož rozměry a souřadnice středu v Å (viz obr. 5.17) byly zapsány do vstupního textového souboru.

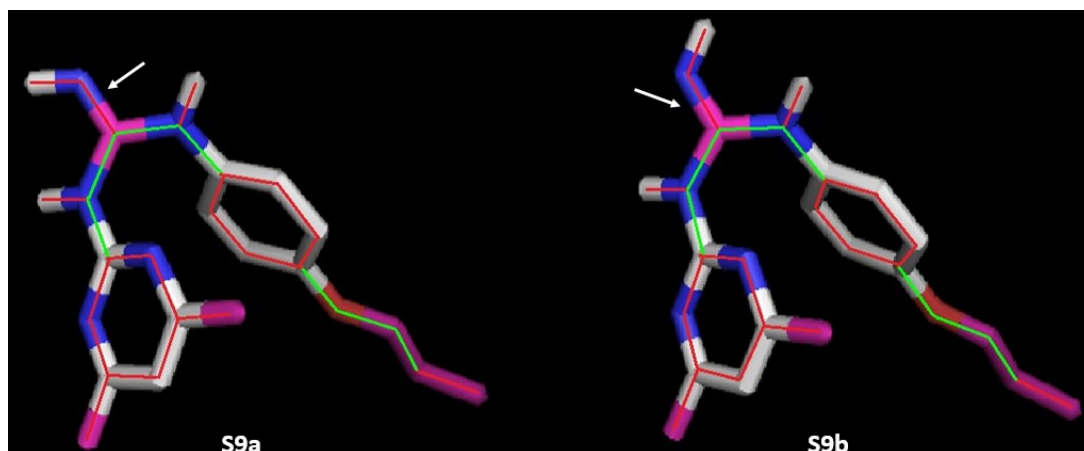


Obr. 5.17 Vymezení výpočetního prostoru, tzv. search space pomocí funkce Grid box v programu AutoDockTools v1.5.6 (Morris *et al.*, 2009). Na obrázku je FOXO3 DBD s vybranými flexibilními rezidui, jejichž atomy jsou označeny žlutými křížky. Kvádr představuje vymezení tzv. search space. V okně v levém horním rohu jsou rozměry kvádra a souřadnice jeho středu v Å.

Zablokování rotace dvojně vazby guanidinové skupiny generuje dva izomery sloučeniny S9, tyto byly pojmenovány S9a a S9b, oba izomery jsou uvedeny na obr. 5.18, str. 73. Výpočty byly provedeny pro každý izomer zvlášť. Struktury obou izomerů byly vytvořeny v programu HyperChem(TM) Professional 8.0.8, Hypercube, Inc., USA.

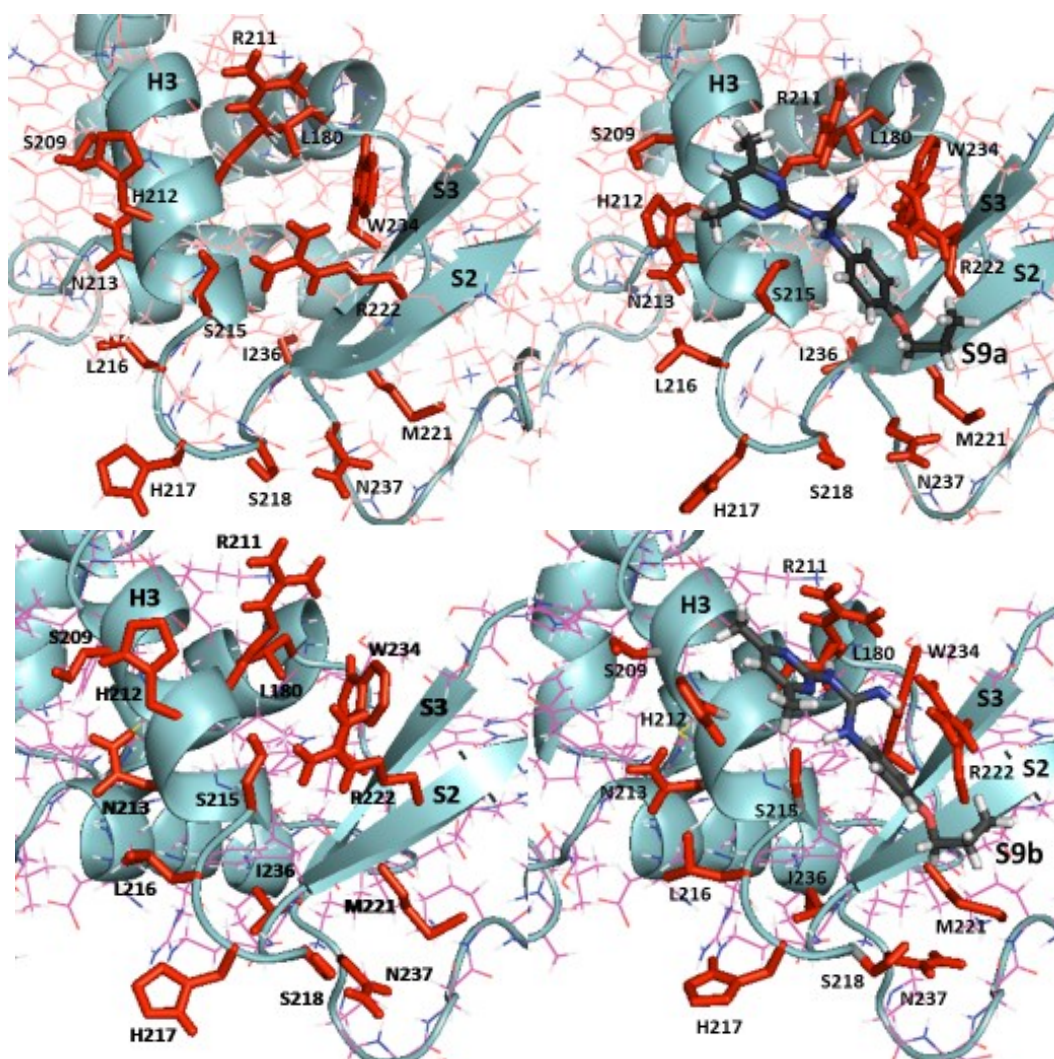


V programu AutoDockTools v1.5.6 byly následně definovány rotovatelné vazby pro oba izomery (viz obr. 5.18, str. 73), takto připravené vstupní soubory byly pojmenovány S9a.pdbqt a S9b.pdbqt.



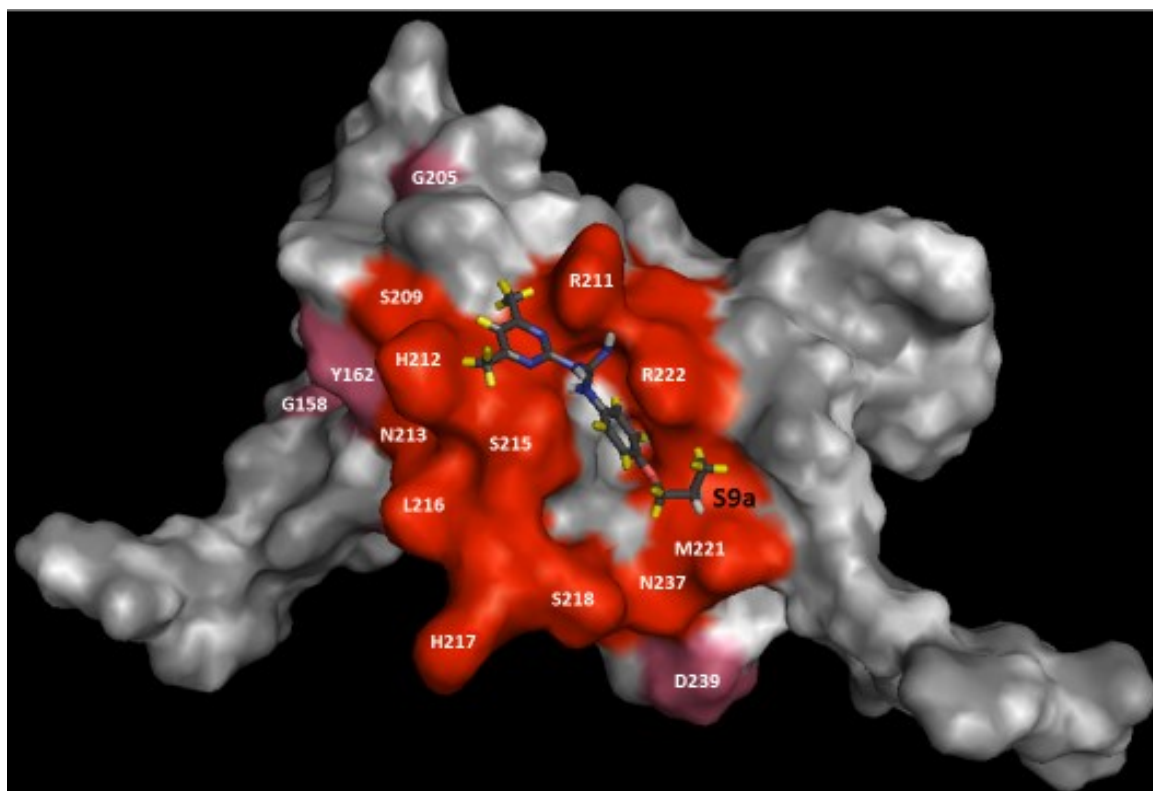
Obr. 5.18 2 izomery sloučeniny S9 oxalát. Zeleně jsou vyznačeny vazby s povolenou rotací, červeně jsou vyznačeny nerotovatelné vazby. Dvojná vazba guanidinové skupiny je vyznačena bílou šipkou. Obrázek byl vytvořen v programu The PyMol Molecular Graphics System, v.0.99, Shrödinger, LLC.

Pro každý izomer byl výpočet s použitím programu AutoDock Vina proveden 10×. Výsledné konformace byly pro oba izomery téměř identické. Konformace na obr. 5.19, str. 74 vpravo představuje reprezentativní vazebné konformace pro sloučeniny S9a a S9b získané na základě molekulového dokování.



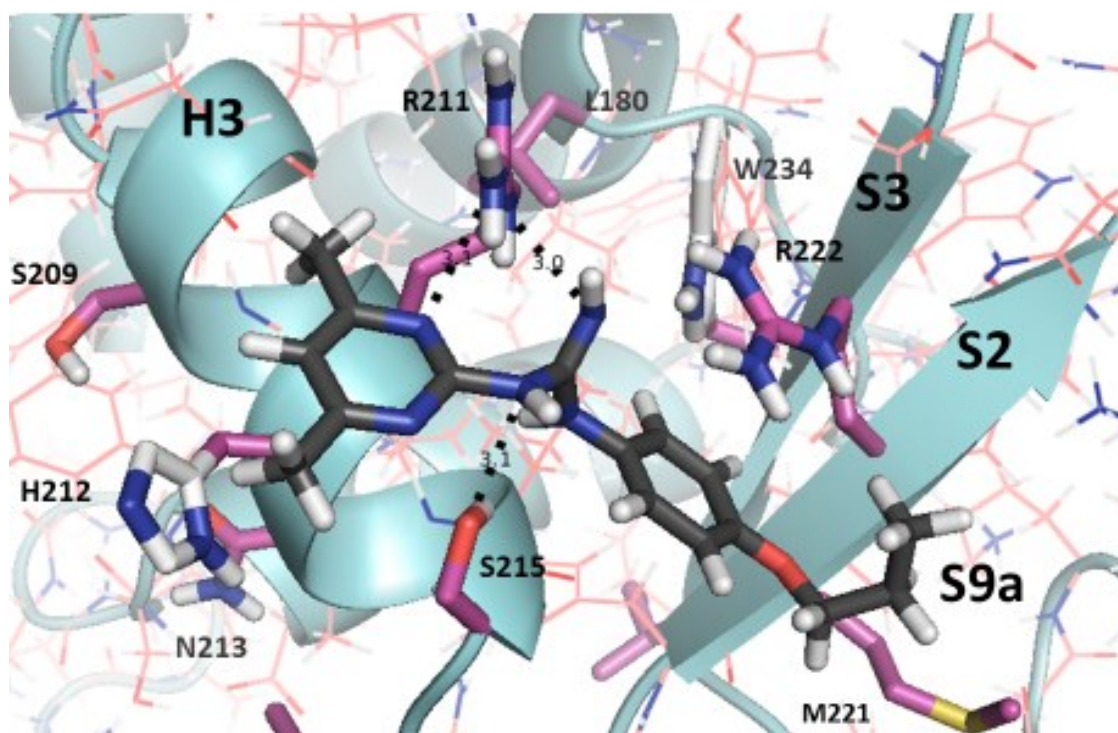
Obr. 5.19 Znáornění vazebného místa pro sloučeninu S9 oxalát (resp. S9) na základě výsledků molekulového dokování. Nalevo je znázorněna počáteční konformace, tj. NMR struktura FOXO3 DBD (Wang et al., 2008), napravo pak výsledná konformace získaná na základě molekulového dokování. Struktury červeně vyznačených flexibilních reziduí (tyčinková reprezentace) obsahují pouze atomy H vázané polární vazbou. Obrázek byl vytvořen v programu The PyMol Molecular Graphics System, v.0.99, Schrödinger, LLC.

Na obr. 5.20, str. 75 je reprezentace vazebné konformace sloučeniny S9 oxalát, žlutě jsou vyznačeny protony sloučeniny S9 oxalát, které dávají signál při STD experimentu (viz obr. 5.16, str. 71), a tudíž by měly být v přímé blízkosti povrchu proteinu. Z obrázku je vidět, že výsledky molekulového dokování jsou v souladu s STD NMR experimentem.



Obr. 5.20 Repräsentace vazebné konformace pro DNA a S9 oxalát. Na Obrázku je DBD FOXO3 se sloučeninou S9 oxalát v konformaci získané pomocí molekulového dokování. Růžový povrch odpovídá reziduíům, která mají signifikantní CSP při titraci ligandem v sérii 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC NMR experimentů, ale nebyla vybrána jako flexibilní. Červeně jsou vyznačena rezidua, která byla vybrána jako flexibilní (analogicky s tab.12 5.3, str. 69). Šedý povrch odpovídá částí polypeptidového řetězce, která byla v průběhu molekulového dokování rigidní. Obrázek byl vytvořen v programu The PyMol Molecular Graphics System, v.0.99, Schrödinger, LLC.

Pomocí metod molekulového dokování byla předpovězena nejen vazebná konformace, ale i interakce mezi sloučeninou S9 oxalát a FOXO3 DBD vázaných nekovalentně. Rezidua klíčová pro vazbu sloučeniny S9 oxalát jsou His212, Arg211, Arg222, Ser215 a Trp234. Rezidua  $\alpha$  helixu H3, His212, Arg211 a Ser215, jsou zároveň klíčová pro specifickou vazbu DNA. Arg222 a Trp234 interagují nespecificky s fosfátovou skupinou cukr-fosfátové kostry DNA (viz obr. 2.8, str. 21). Interakce mezi FOXO3 DBD a S9 oxalát jsou znázorněny na obr. 5.21, str. 76. His212 interaguje se sloučeninou S9 oxalát prostřednictvím van der Waalsových interakcí. Ser215 a Arg211 interagují se sl. S9 oxalát prostřednictvím vodíkových můstků. Arg222 a Trp234 interagují se sl. S9 oxalát prostřednictvím van der Waalsových interakcí.



Obr. 5.21 Detailní znázornění vazebné konformace sl. S9 oxalát nekovalentně vázané na FOXO3 DBD. Na Obrázku je DBD FOXO3 se sloučeninou S9 oxalát v konformaci získané pomocí molekulového dokování. Flexibilní rezidua jsou vyznačena pomocí tyčinkové reprezentace a obsahují pouze atomy H vázané polární vazbou. Vodíkové vazby jsou vyznačeny přerušovanou čarou. Obrázek byl vytvořen v programu The PyMol Molecular Graphics System, v.0.99, Schrödinger, LLC.

## 6 Diskuze

Cílem této práce bylo studovat inhibici interakce FOXO3 DBD a molekuly DNA obsahující FOXO proteiny rozpoznávaný IRE motiv. Jako inhibitor byla použita sloučenina S9 oxalát a inhibice byla studována pomocí analýzy elektroforetické mobility, EMSA. Dále byla studována interakce sl. S9 oxalát a FOXO3 DBD pomocí NMR a metod molekulového dokování. Pro experimenty v této práci bylo nutné připravit jak neznačenou, tak  $^{15}\text{N}$  značenou DNA-vazebnou doménu FOXO3 proteinu, sekvenci aminokyselin 156-269.

Příprava FOXO 3 DBD se skládala z jeho exprese v buňkách *E. coli* a následné purifikace. Purifikace proteinu FOXO3<sub>156-269</sub> zahrnovala několik kroků: GST chromatografii, dialýzu a odštěpení GST kotvy, kationtově-výměnnou chromatografii a gelovou permeační chromatografii. Kationtově-výměnná chromatografie nepřinesla výrazné zvýšení čistoty proteinového preparátu, proto byla v důsledku urychlení purifikace vynechána. Čistota proteinového preparátu byla po každém kroku analyzována pomocí 15% SDS-PAGE. Neznačený i  $^{15}\text{N}$  značený protein FOXO3<sub>156-269</sub> byly připraveny s postačujícím výtěžkem i čistotou a mohly být použity pro experimenty v této práci.

Pomocí analýzy elektroforetické mobility, EMSA, byla studována schopnost sloučeniny S9 oxalát inhibovat vazbu FOXO3<sub>156-269</sub> a DNA. Na gelech barvených stříbrem byla pozorována zóna volné DNA u vzorků s přidavkem sloučeniny S9 oxalát, tato zóna se rozšiřovala v závislosti na koncentraci inhibitoru ve vzorku. Bylo potvrzeno, že sloučenina S9 oxalát je skutečně schopna inhibovat interakci FOXO3 DBD s DNA s IRE motivem. Pozorovaný inhibiční efekt je však slabý pravděpodobně v důsledku nízké vazebné afinity sloučeniny S9 oxalát a FOXO3 DBD ( $K_D$  odhadnutá vynesemím závislosti CSP na koncentraci ligandu je  $(8 \pm 2) \cdot 10^{-4}$ , odhad provedla RNDr. Katarína Pšenáková). Rovněž se ukázalo, že samotný oxalát má také určitou schopnost inhibovat interakci FOXO3 DBD s DNA, inhibiční efekt však není tak silný jako u sloučeniny S9 oxalát.

NMR experimenty byly použity pro identifikaci reziduí DBD FOXO3, která se účastní vazby sloučeniny S9 oxalát a identifikaci protonů sloučeniny S9 oxalát, které se nachází v přímé blízkosti povrchu DBD FOXO3. Na základě vyhodnocení CSP pro nejnižší koncentraci ligandu ve vzorku ( $1,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) v  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  2D HSQC experimentu byla vybrána rezidua, která tvoří vazebný povrch pro sloučeninu S9 oxalát. Tato rezidua byla následně použita při molekulovém dokování, kde byla vybrána jako flexibilní.

STD NMR experiment ukázal, že některá  $^1\text{H}$  jádra sloučeniny S9 oxalát se nachází v přímé blízkosti FOXO3 DBD, což potvrzuje přímou interakci sloučeniny S9 oxalát a FOXO3 DBD. Jde o  $^1\text{H}$  jádra propoxyfenylové skupiny,  $^1\text{H}$  jádra pyrimidinového kruhu a  $^1\text{H}$  jádra methylových skupin pyrimidinového kruhu

Pomocí metod molekulového dokování byla předpovězena vazebná konformace pro sloučeninu S9 oxalát a DBD FOXO3, která byla v dobré shodě s NMR experimenty. Rezidua klíčová pro vazbu sloučeniny S9 oxalát jsou His212, Arg211, Arg222, Ser215 a Trp234. Rezidua  $\alpha$  helixu H3, His212, Arg211 a Ser215, jsou zároveň klíčová pro specifickou vazbu DNA. Výsledky experimentů v této práci ukázaly, že sloučenina S9 oxalát je schopna inhibovat interakci FOXO3 DBD a DNA prostřednictvím interakce s rezidui DBD, která jsou klíčová pro vazbu DNA.

## 7 Závěr

- Byla připravena neznačená i  $^{15}\text{N}$  značená DNA-vazebná doména proteinu FOXO3 (sekvence aminokyselin 156-269) s dostatečným výtěžkem a o postačující čistotě.
- Pomocí analýzy elektroforetické mobility, EMSA, bylo ukázáno, že sloučenina S9 oxalát je schopna inhibovat interakci FOXO3 DBD s DNA obsahující IRE motiv.
- NMR experimenty ukázaly, že sloučenina S9 oxalát interaguje přímo s DNA-vazebnou doménou transkripčního faktoru FOXO3, konkrétně s oblastí tvořící významnou část DNA-vazebného povrchu.
- Pomocí metod molekulového dokování byla předpovězena vazebná konformace pro sloučeninu S9 oxalát a FOXO3 DBD.
- Na základě výsledků NMR experimentů a molekulového dokování byly navrženy možné interakce mezi sloučeninou S9 oxalát a FOXO3 DBD.

## 8 Seznam citované literatury

- [1] Bassam, B. J., Caetano-Anollés, G.: Silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 42(2–3), 181–188 (1993)
- [2] Bassam, B. J., Caetano-Anollés, G., Gresshoff, P. M.: Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 196(1), 80–83 (1991)
- [3] Burgering, B. M. T.: A brief introduction to FOXology. *Oncogene*, 27(16), 2258–2262 (2008)
- [4] Carter, M. E., Brunet, A.: FOXO transcription factors. *Current Biology*, 17(4), R113-4 (2007)
- [5] Cavanagh, J., Fairbrother, W. J., Palmer III, A. G., Rance, M., Skelton, N. J.: Protein NMR spectroscopy: Principles and practice, 2nd edition, Elsevier (2007)
- [6] Daitoku, H., Sakamaki, J., Fukamizu, A.: Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein-protein interactions. *Biochimic. Biophysic. Acta*, 1813(11), 1954–1960 (2011)
- [7] Dračínský, M.: Nukleární magnetická rezonance, (2009)
- [8] Forli, S., Huey, R., Pique, M. E., Sanner, M., Goodsell, D. S., Arthur, J.: Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nat. Protoc.*, 11(5), 905-919 (2016)
- [9] Frangioni, J.V., Neel, B.G.: Solubilization and purification of enzymatically active glutathione s-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal. Biochem.*, 210, 179-87 (1993)
- [10] Gormally, M. V., Dexheimer, T. S., Marsico, G., Sanders, D. A., Lowe, C., Matak-Vinkovic, D., Michael, S., Jadhav, A., Rai, G., Maloney, D. J., Simeonov, A., Balasubramanian, S.: Suppression of the FOXM1 transcriptional programme via novel small molecule inhibition. *Nature Communications*, 5, 51-65 (2014)
- [11] Hagenbuchner, J., Rupp, M., Salvador, C., Meister, B., Kiechl-Kohlendofer, U., Muller, T., Geiger, K., Sergi, C., Obexer, P., Ausserlechner, M. J.: Nuclear FOXO3 predicts adverse clinical outcome and promotes tumor angiogenesis in neuroblastoma. *Oncotarget*, 7(47), 77591-77606 (2016)



- [12] Lawrence, A.-M., Besir, H.: Staining of proteins in gels with Coomassie G-250 without organic solvent and acetic acid. *Journal of Visualized Experiments*, 30, 2–4 (2009)
- [13] Liu, Q., Yi, L., Sadiq-Ali, S., Koontz, S. M., Wood, A., Zhu, N., & Jackson, S. H.: PP2A-dependent control of transcriptionally active FOXO3a in CD8+central memory lymphocyte survival requires p47phox. *Cell Death and Disease*, 3(8), 1–10 (2012)
- [14] Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., Olson, A. J.: Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Computational Chemistry*, 16, 2785–91 (2009)
- [15] Nelson, D. L., Cox, M. M.: *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th edition, W.H. Freeman and Company, New York (2008).
- [16] Obsil, T., Obsilova, V.: Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. *Oncogene*, 27(16), 2263–2275 (2008)
- [17] Obsil, T., Obsilova, V.: Structural basis for DNA recognition by FOXO proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1813(11), 1946–1953 (2011)
- [18] Opekar, F., Jelínek, I., Rychlovský, P., Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*, 2. vydání, Karolinum, Praha (2010)
- [19] Phillips, T., Hoopes, L.: Transcription factors and transcriptional control in eukaryotic cells. *Nature Education*, 1(1), 119 (2008)
- [20] Rena, G., Woods, Y. L., Prescott, A. R., Peggie, M., Unterman, T. G., Williams, M. R., Cohen, P.: Two novel phosphorylation sites on FKHR that are critical for its nuclear exclusion. *EMBO Journal*, 21(9), 2263–2271 (2002)
- [21] Ryšlavá, H., Liberda, J., Hýsková, V., Martínek, V., Man, P., Novák, P., Kavan, D.: *Návody biochemických praktik I*, (2017)
- [22] Šícho, M., Svozil, D.: Molekulové dokování jako nástroj pro návrh léčiv. *Chemické listy*, 111, 754–759 (2017)
- [23] Trott, O., Olson, A. J.: AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31, 455–461 (2010)
- [24] Tsai, K. L., Sun, Y. J., Huang, C. Y., Yang, J. Y., Hung, M. C., & Hsiao, C. D.: Crystal structure of the human FOXO3a-DBD/DNA complex suggests the effects of post-translational modification. *Nucleic Acids Research*, 35(20), 6984–6994 (2007)

- [25] Vacha, P., Zuskova, I., Bumba, L., Herman, P., Vecer, J., Obsilova, V., Obsil, T.: Detailed kinetic analysis of the interaction between the FOXO4-DNA-binding domain and DNA. *Biophysical Chemistry*, 184, 68–78 (2013)
- [26] Venkitakrishnan, R. P., Benard, O., Max, M., Markley, J. L.: Use of NMR saturation transfer difference spectroscopy to study ligand binding to membrane proteins. *Methods Mol Biol.*, 914, 47-63 (2012)
- [27] Vohlídal, J.: Chemická kinetika, Karolinum, Praha (2001)
- [28] Wang, F., Marshall, C. B., Yamamoto, K., Li, G.Y., Plevin, M. J., You, H., Ikura, M.: Biochemical and Structural Characterization of an Intramolecular Interaction in FOXO3a and Its Binding with p53. *Journal of Molecular Biology*, 384(3), 590–603 (2008)
- [29] Wang, Y., Zhou, Y., Graves, D. T.: FOXO transcription factors: Their clinical significance and regulation. *BioMed Research International*, (2014)
- [30] Weigel, D., Jürgens, G., Küttner, F., Seifert, E., Jäckle, H.: The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell*, 57(4), 645–658 (1989)
- [31] Williamson, M. P.: Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 73, 1–16 (2013)
- [32] Xie, Q., Chen, J., & Yuan, Z.: Post-translational regulation of FOXO Phosphorylation of FOXO Ubiquitination of FOXOs Acetylation of FOXOs. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 44(11), 897–901 (2012)