

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

**Katedra fyzikální a makromolekulární chemie**

---



STUDIUM INTERAKCE C-KONCE DNA-VAZEBNÉ  
DOMÉNY FOXO4 S DNA

Study of the interaction between the C-terminus of DNA-binding  
domain of FOXO4 and DNA

Bakalářská práce  
studijního oboru Chemie v přírodních vědách

Praha 2010

Iva Zusková

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 31. května 2010

## Poděkování

Děkuji svému školiteli Doc. RNDr. Tomášovi Obšilovi, Ph.D. za odborné rady a vedení při práci.

Děkuji Mgr. Lence Řežábkové a RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D. za trpělivou pomoc při práci v laboratoři.

Děkuji celému kolektivu studentů za vytvořené přátelské prostředí.

Děkuji svým rodičům za poskytnuté zázemí a podporu.

## ABSTRAKT

Forkhead transkripční faktory jsou strukturně příbuzné molekuly obsahující přibližně 110 aminokyselin-velkou konzervovanou DNA-vazebnou doménu známou jako forkhead doména. Protein FOXO4 náleží do podskupiny "O" forkhead transkripčních faktorů. Zástupci podskupiny FOXO forkhead transkripčních faktorů se podílejí na mnoha důležitých biologických procesech. FOXO faktory se účastní kontroly metabolismu, buněčného cyklu, apoptózy a ochrany vůči oxidativnímu stresu. DNA-vazebná doména členů FOXO se skládá ze tří  $\alpha$ -helixů (H1, H2 a H3), tří  $\beta$ -vláken (S1, S2 a S3) a dvou flexibilních ohybů (nazývaných jako křídla W1 a W2). Úloha ohybu W2 při vazbě FOXO na DNA je nejasná. Ohyb W2 pravděpodobně interaguje s oblastí DNA předcházející hlavní vazebný motiv FOXO faktorů. Spekuluje se, že vazebná afinita DNA-vazebné domény FOXO4 k DNA roste s obsahem A-T párů v oblasti DNA předcházející hlavní vazebný motiv. Pro ověření této hypotézy byla exprimována a purifikována DNA-vazebná doména FOXO4 a byla určena její vazebná afinita ke třem různým DNA duplexům lišících se obsahem A-T párů v oblasti před hlavní vazebnou sekvencí. Vazebná afinita byla určena pomocí měření změn stacionární anisotropie fluorescence. Toto stanovení neukázalo žádné signifikantní rozdíly mezi vazebnou afinitou DNA-vazebné domény FOXO4 k DNA o různém obsahu A-T párů v oblasti před hlavním vazebným motivem.

## **ABSTRACT**

Forkhead transcription factors are structurally similar molecules containing approximately 110-amino-acid-long DNA-binding domain known as a forkhead domain. Protein FOXO4 is a member of subgroup "O" of forkhead transcription factors. Members of this subgroup play a key role in many biologically important processes. For example, FOXO factors participate in metabolism control, cell-cycle control, apoptosis and oxidative stress resistance. The forkhead domain (DNA-binding domain) consists of three  $\alpha$ -helices (H1, H2 and H3), three  $\beta$ -strands (S1, S2 and S3) and two flexible loops (called wings W1 and W2). The role of the wing W2 in FOXO binding to the target DNA is still elusive. Wing W2 probably interacts with the DNA in the region upstream of the core motif. It has been speculated that the FOXO DNA-binding affinity depends on A-T content (number of A-T pairs) in the region upstream of the core motif. In order to investigate this hypothesis, DNA-binding domain of the FOXO4 protein was expressed and purified and it was determined its binding affinity for three molecules of double stranded DNA containing different number of A-T pairs in the region upstream of the core motif using steady-state fluorescence anisotropy-based method. Our results show no significant differences between obtained FOXO4 binding affinities to tested DNA molecules.

# OBSAH

<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>8</b>
<b>1 Úvod</b> .....	<b>10</b>
<b>2 Literární přehled</b> .....	<b>11</b>
2.1 Transkripční faktory .....	11
2.2 Forkhead transkripční faktory.....	12
2.3 FOXO transkripční faktory .....	12
2.3.1 Struktura FOXO.....	13
2.3.2 Interakce FOXO s DNA .....	14
2.3.3 Regulace FOXO.....	15
2.3.3.1 Fosforylace FOXO.....	16
2.3.3.2 Proteiny 14-3-3 .....	16
2.3.3.3 Odpověď na oxidativní stres.....	18
2.3.4 Funkce FOXO.....	19
<b>3 Cíle práce</b> .....	<b>20</b>
<b>4 Materiály a metody</b> .....	<b>21</b>
4.1 Použitý materiál .....	21
4.1.1 Chemikálie .....	21
4.1.2 Přístroje.....	22
4.1.3 Ostatní.....	22
4.2 Exprese FOXO4 82–207.....	23
4.3 Purifikace FOXO4 82–207 .....	25
4.3.1 Niklová chelatační chromatografie.....	25

4.3.2	Dialýza .....	26
4.3.3	Kationtově výměnná chromatografie.....	27
4.3.4	Určení koncentrace .....	28
4.3.5	Štěpení thrombinem.....	28
4.3.6	Gelová permeační chromatografie.....	29
4.3.7	SDS–PAGE.....	29
4.4	Měření DNA vazebné afinity FOXO4 82–207 pomocí změn stacionární anisotropie fluorescence .....	32
4.4.1	Příprava Flc-dsDNA z oligonukleotidů .....	33
4.4.2	Měření stacionární anisotropie fluorescence .....	34
4.4.3	Vyhodnocení výsledků měření .....	35
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>36</b>
5.1	Purifikace FOXO4 82–207 .....	36
5.1.1	Niklová chelatační chromatografie.....	36
5.1.2	Kationtově výměnná chromatografie.....	37
5.1.3	Gelová permeační chromatografie.....	39
5.2	Měření DNA vazebné afinity FOXO4 82–207 pomocí změn stacionární anisotropie fluorescence .....	40
<b>6</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>46</b>
<b>8</b>	<b>Seznam citované literatury .....</b>	<b>47</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A.....	adenin
APS .....	peroxodisíran amonný
ATP .....	adenosintrifosfát
C .....	cytosin
CTP .....	cytidintrifosfát
DAF-16 .....	FOXO homolog z <i>Caenorhabditis elegans</i>
DBD .....	DNA-vazebná doména
DEAE-celulóza .....	diethylaminoethyl-celulóza
DNA.....	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA .....	dvojvláknová DNA
DTT .....	1,4-dithiotreitol
<i>E. coli</i> .....	<i>Escherichia coli</i>
EDTA.....	kyselina ethylendiamintetraoctová
Flc .....	fluorescein
FOX.....	forkhead box
FOXO.....	podskupina "O" forkhead transkripčních faktorů
G.....	guanin
Gly.....	glycin
GTP .....	guanosintrifosfát
His .....	histidin
IGF-1 .....	růstový faktor podobný insulinu
IPTG.....	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
JNK1 .....	proteinkinasa účastnící se apoptózy, regulace buněčného cyklu a diferenciace
LB médium .....	médium podle Luria-Bertani
Lys.....	lysin
mRNA .....	messenger ribonukleová kyselina
MST1 .....	proteinkinasa účastnící se apoptózy



NES .....	jaderná exportní sekvence
NLS .....	jaderný lokalizační signál
OD .....	optická densita
PAGE .....	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PBS .....	roztok fosfátového pufru a NaCl
PI3K-PKB/Akt .....	signální dráha řízená aktivitou fosfatidylinositol-3-kinasy a proteinkinasy B
PKB/Akt .....	proteinkinasa B
PMSF .....	fenylmethylsulfonylfluorid
RNA .....	ribonukleová kyselina
rpm .....	otáčky za minutu
rRNA .....	ribosomální ribonukleová kyselina
SDS .....	dodecylsírán sodný
Ser .....	serin
SGK .....	serum and glucocorticoid-induced kinase
smh .....	standard molekulových hmotností
T .....	thymin
TD .....	transaktivační doména
TEMED .....	N,N,N',N'-tetraethylendiamin
Thr .....	threonin
Tris .....	tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA .....	transferová ribonukleová kyselina
U .....	jednotka enzymové aktivity (takové množství enzymu, které katalyzuje přeměnu 1 molu substrátu za minutu za standardních podmínek)
UTP .....	uridintrifosfát
v/v .....	volume/volume (objem/objem)
w/v .....	weight/volume (hmotnost/objem)
βME .....	2-thioethanol

# 1 ÚVOD

Protein FOXO4 je členem podskupiny "O" forkhead transkripčních faktorů. Transkripční faktory jsou proteiny, které se účastní transkripce genů a mohou transkripci aktivovat či inhibovat.

Forkhead proteiny jsou kódované forkhead geny, které byly poprvé identifikovány v raném stadiu embrya *Drosophila melanogaster*. Ukázalo se, že forkhead geny působí na konečný embryonální vývoj. Na základě této funkce získali své označení forkhead (= vidličková hlava).<sup>[4]</sup> Forkhead transkripční faktory jsou evolučně konzervované a obsahují charakteristický DNA-vazebný motiv, označovaný jako forkhead doména. Nyní již bylo identifikováno více než 100 členů skupiny forkhead transkripčních faktorů, které hrají roli v buněčném vývoji, diferenciaci a proliferaci, apoptóze, metabolismu a odolnosti vůči stresu. Zdá se, že během evoluce se počet forkhead genů zvyšoval, u obratlovců byl identifikován větší počet různých forkhead genů než u bezobratlých. U člověka má rodina forkhead genů – forkhead box (= FOX) – nejméně 43 členů.<sup>[5]</sup>

Zástupci třídy "O" forkhead transkripčních faktorů (FOXO) hrají stěžejní roli v regulaci vývoje buňky a ovlivňují procesy jako je buněčná smrt, buněčná proliferace a buněčný metabolismus. Kromě toho bylo na modelových organismech demonstrováno, že činnost FOXO ovlivňuje délku života těchto organismů. Činnost FOXO transkripčních faktorů je regulována četnými dráhami přenášejícími signál v buňce. Hlavním regulačním faktorem je fosforylace proteinkinasou B (PKB/Akt), která je důležitou součástí insulinové signální dráhy. Dohromady vzato, FOXO transkripční faktory působí na křižovatce mezi stárnutím a se stárnutím spojenými chorobami jako je diabetes a rakovina.<sup>[5]</sup>

I přes intenzivní studium těchto proteinů je stále nejasné, jakým způsobem je regulována jejich interakce s DNA. Strukturní studie komplexů forkhead proteinů s DNA naznačily, že jedním z faktorů ovlivňujících tuto interakci je sekvence předcházející hlavní vazebný motiv.<sup>[1, 2, 3]</sup> Tato bakalářská práce si klade za cíl zjistit, jestli interakce DNA-vazebné domény forkhead transkripčního faktoru FOXO4 s DNA závisí na obsahu A-T párů v oblasti předcházející hlavní vazebný motiv.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Transkripční faktory

Exprese genu je proces, při kterém je genetická informace převedena v reálně existující buněčnou strukturu nebo funkci. Tomuto procesu odpovídá několika kroková syntéza proteinu, který je tímto genem kódován a kterým je pak daná funkce realizována. Jedním z kroků syntézy proteinu je transkripce. Transkripce je proces, při kterém je jedno vlákno molekuly DNA použito jako šablona (templát) pro syntézu komplementární RNA. Existují tři hlavní typy RNA – rRNA, tRNA a mRNA – a všechny se podílejí na syntéze proteinů, přičemž mRNA přímo specifikuje sekvenci proteinů.

Enzym odpovědný za syntézu RNA řízenou DNA se nazývá RNA-polymerasa. Tento enzym má několik komplexních funkcí, které zahrnují vazbu templátu DNA, iniciaci syntézy RNA na specifickém místě templátu DNA, elongaci řetězce RNA a terminaci řetězce RNA. RNA-polymerasa katalyzuje vznik fosfodiesterových vazeb mezi nukleosidtrifosfáty (ATP, CTP, GTP, UTP), z nichž je tvořen řetězec RNA. Eukaryotní buňky obsahují čtyři až pět různých RNA-polymeras, přičemž každá syntetizuje jiný typ RNA. Geny kódující proteiny přepisuje RNA-polymerasa II.<sup>[6]</sup>

K započetí transkripce většiny eukaryotických genů je třeba vzniku tzv. transkripčního iniciačního komplexu. Transkripční iniciační komplex se skládá z RNA-polymerasy II a různých iniciačních faktorů vázaných na oblast promotoru, což je sekvence DNA, která určuje polohu zahájení transkripce. Tyto iniciační faktory, které umisťují RNA-polymerasu II na transkripční iniciační místo, jsou nazývány obecné transkripční faktory, protože se předpokládá, že tyto proteiny jsou potřebné pro transkripci většiny genů, které jsou přepisovány tímto typem RNA-polymerasy.<sup>[7]</sup> Obecné transkripční faktory jsou tedy proteiny, které z velké míry zajišťují regulaci transkripce.

Obecné transkripční faktory podobné působnosti byly izolovány z kultivovaných lidských buněk, krysích jater, embryí *Drosophila melanogaster* a z kvasinek. Ve všech

případech jsou ekvivalentní obecné transkripční faktory z různých eukaryotických organismů vysoce konzervovány.<sup>[7]</sup>

## 2.2 Forkhead transkripční faktory

Forkhead transkripční faktory jsou skupinou strukturně příbuzných transkripčních aktivátorů, které byly nalezeny v rozmanité škále druhů od kvasinek po člověka.<sup>[8]</sup>

Forkhead transkripční faktory obsahují DNA-vazebnou doménu známou jako forkhead doména, která je tvořena "okřídleným" helikálním řetězcem přibližně 110 aminokyselin.<sup>[9]</sup>

První forkhead transkripční faktor byl identifikován v octomilkách a označení forkhead transkripčních faktorů bylo odvozeno od *Drosophila melanogaster* forkhead genu, který je nezbytný pro správnou konečnou stavbu embrya.<sup>[9]</sup>

Forkhead proteiny zastávají řadu odlišných funkcí a uplatňují se mnoha způsoby v buněčném vývoji, proliferaci a diferenciaci, obraně vůči stresu, apoptóze a kontrole metabolismu.<sup>[9]</sup>

Všechny forkhead proteiny vykazují vysoký stupeň identity v aminokyselinové sekvenci jejich DNA vazebné domény a představují samostatnou rodinu uvnitř nadskupiny "winged helix protein", které se vyskytují v eukaryotních i prokaryotních geonomech.<sup>[9]</sup>

## 2.3 FOXO transkripční faktory

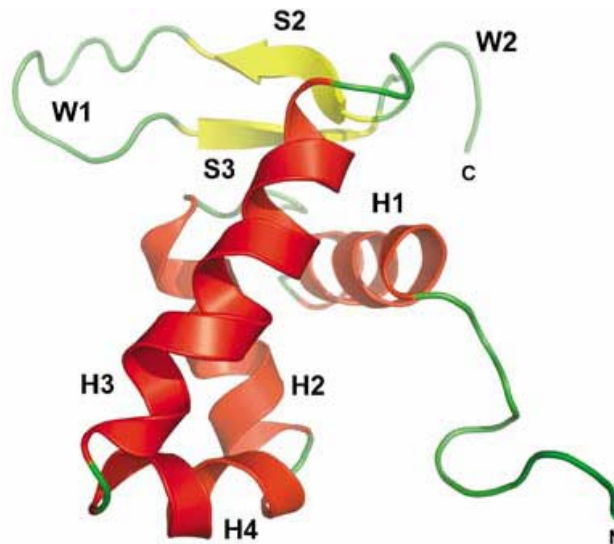
FOXO je podskupina forkhead transkripčních faktorů. FOXO transkripční faktory jsou spojené s množstvím biologických procesů včetně buněčného cyklu, buněčné smrti, opravy poškozené DNA, metabolismu a ochrany před oxidativním stresem.<sup>[10]</sup> Funkce těchto důležitých molekul musí být přísně kontrolována širokou škálou protein-protein interakcí a posttranslačních modifikací zahrnující fosforylaci, acetylaci a ubiquitinaci.<sup>[9]</sup>

Nyní již byly FOXO proteiny identifikovány v několika různých organismech včetně *Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, myši, krysy a člověka.<sup>[10]</sup> FOXO transkripční faktory, vyskytující se v obratlovcích, jsou ekvivalentní DAF-16 transkripčnímu faktoru nalezenému v *Caenorhabditis elegans*.<sup>[11]</sup>

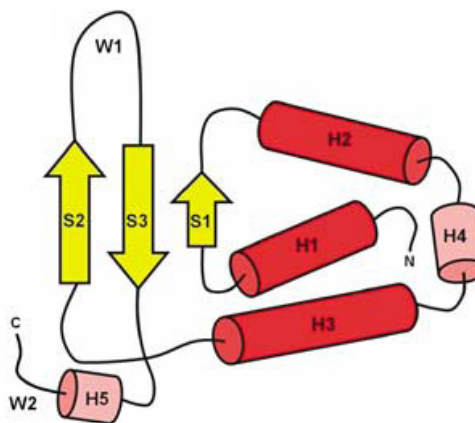
FOXO skupina transkripčních faktorů obsahuje čtyři členy: FOXO1, 3, 4 a 6. Alternativní jména pro tyto geny a jimi určené proteiny používané v dřívějších studiích jsou FKHR pro FOXO1, FKHL1 pro FOXO3 a AFX nebo Mllt7 pro FOXO4. FOXO1, FOXO3 a FOXO4 jsou všudypřítomně exprimovány, ale mezi různými typy buněk nebo různými orgány se míra exprese těchto genů může značně lišit. Například FOXO1 je významně exprimován v tukové tkáni, zatímco FOXO4 je významně exprimován ve svalech a FOXO3 v játrech. Exprese FOXO6 je omezená na mozek.<sup>[5]</sup>

### 2.3.1 Struktura FOXO

Forkhead/winged helix motiv je kompaktní struktura obsahující okolo 110 aminokyselinových zbytků, které se skládají do tří  $\alpha$ -helixů (H1, H2 a H3), tří  $\beta$ -vláken (S1, S2 a S3) a dvou flexibilních ohybů podobných motýlím křídům (W1 a W2) – odtud pochází označení winged helix. Stuhová reprezentace této struktury je na obr. 2.1. Topologické uspořádání forkhead domény je H1 – S1 – H2 – H3 – S2 – W1 – S3 – W2 (viz obr. 2.2). Vlákno S1 vložené mezi helixy H1 a H2 interaguje s vlákny S2 a S3, tím je utvořen třívláknový stočený antiparalelní  $\beta$ -list. Zatímco N-koncová část domény je tvořena shlukem tří  $\alpha$ -helixů, C-konec tvoří  $\beta$ -vlákna S2 a S3 a dva velké ohyby W1 a W2, které vystupují z  $\beta$ -listu.<sup>[9]</sup> Nejvíce konzervované sekvence v DNA-vazebné doméně nalezneme ve třech helixech H1, H2 a H3.<sup>[12]</sup>



**Obr. 2.1** Stuhová reprezentace trojrozměrné struktury sekvence Ser92-Gly181 forkhead domény proteinu FOXO4.<sup>[13]</sup>



**Obr. 2.2** Zobrazení topologie forkhead domény.<sup>[9]</sup>

### 2.3.2 Interakce FOXO s DNA

Forkhead doména FOXO proteinů se váže jako monomer na sekvenci 5'-GTAAACAA-3' známou jako vazebný element rodiny DAF-16. (DAF-16 je homologem k FOXO transkripčním faktorům exprimovaný v *Caenorhabditis elegans*.<sup>[10]</sup>) Tato sekvence obsahuje hlavní vazebný motiv 5'-(A/C)AA(C/T)A-3' rozpoznávaný všemi členy forkhead rodiny.<sup>[9]</sup>

DNA je rozpoznávána hlavně konzervovanou sekvencí  $\alpha$ -helixu H3, která vytváří řadu kontaktů (vodíkových vazeb) s bazemi nukleotidů ve velkém žlábků DNA.

Dalšími oblastmi forkhead domény, které mohou významně interagovat s DNA, jsou oba ohyby W1 a W2 a N-koncový segment. Tyto oblasti převážně interagují s fosfátovými skupinami cukr-fosfátové kostry molekuly DNA.<sup>[1, 2, 3]</sup> Strukturální studie ukazují, že vazba FOXO na DNA způsobuje pouze malé strukturální změny v DNA-vazebné doméně, ale vyvolává významný ohyb molekuly DNA. Molekulární mechanismus specifčnosti vazby forkhead faktorů na cílovou DNA není stále objasněn. Rozličné forkhead proteiny příslušející do různých podskupin mají téměř identický tvar a pouhé obměny v topologii DNA-vazebné domény nemohou vysvětlit zřetelnou DNA-vazebnou specifčnost. Zdá se, že jiné charakteristiky forkhead proteinů, například rozdíly v distribuci náboje na DNA-vazebném rozhraní, jsou pravděpodobně zodpovědné za DNA-vazebnou specifčnost.<sup>[12]</sup>

Existuje určitá nejasnost o úloze ohybu W2 při vazbě DNA. Tento segment je v dostupných krystalových strukturách přítomen jen u několika struktur. U ostatních nebyl pozorován díky své flexibilitě. Nicméně funkční studie potvrdily, že se podílí na vazbě DNA. Byla formulována hypotéza, že ohyb W2 interaguje s oblastí na 5' konci vazebné sekvence, která je bohatá na A-T páry. V této oblasti by měla být DNA více flexibilní, což by mělo usnadňovat interakci s ohybem W2.<sup>[1, 2, 3]</sup>

### 2.3.3 Regulace FOXO

FOXO transkripční faktory jsou regulovány mnoha vnějšími stimuly. Mohou to být insulin, insulinu podobný růstový faktor (IGF-1), další růstové faktory, neurotrofiny, živiny, cytokiny a oxidativní stres. Tyto podněty kontrolují hladinu FOXO proteinů, jejich lokalizaci uvnitř buňky, DNA-vazebnou aktivitu a transkripční aktivitu. Regulace FOXO je dosahováno změnami v posttranslačních modifikacích FOXO proteinů, zahrnujících fosforylaci, acetylaci, mono- a polyubiquitinaci a možná další dosud neidentifikované modifikace. Posttranslační modifikace FOXO mohou působit dvěma způsoby: ovlivněním konformace FOXO nebo vytvořením specifického vazebného motivu pro FOXO vazebné partnery.<sup>[14]</sup>

Hlavním mechanismem, jakým jsou FOXO transkripční faktory regulovány v odpovědi na vnější podněty, je změna jejich lokalizace uvnitř buňky. Přesné kontroly vnitrobuněčné lokalizace FOXO je dosaženo množstvím posttranslačních modifikací, zejména fosforylací a monoubiquitinací.<sup>[14]</sup>

### 2.3.3.1 Fosforylace FOXO

FOXO skupina transkripčních faktorů je negativně regulována PI3K-PKB/Akt signální dráhou jako odpověď na insulin, insulinu podobné růstové faktory, růstové faktory a neurotrofní faktory. Fosforylace FOXO faktorů na třech konzervovaných místech proteinkinasami PKB/Akt a SGK (serum and glucocorticoid-induced kinase) způsobuje nahromadění FOXO faktorů v cytoplasmě, a tím předchází transaktivaci FOXO cílových genů. Zadržování FOXO proteinů v cytoplasmě je zprostředkováno kombinací vazby na partnera (jiný protein) a změnami ve fyzikálně-chemických vlastnostech FOXO. Fosforylace FOXO enzymy PKB/Akt a SGK na prvním a druhém fosforylačním místě tvoří vazebné místo pro protein 14-3-3. 14-3-3 se váže na FOXO faktory v jádře a urychluje jejich aktivní export. Navázání 14-3-3 také omezuje přístupnost FOXO jaderného lokalizačního signálu a tím blokuje zpětný vstup FOXO do jádra. Takže zadržování FOXO proteinů v cytoplasmě je výsledkem zvýšeného jaderného exportu FOXO a sníženého vstupu FOXO do jádra.<sup>[14]</sup>

Regulace FOXO změnami ve vnitrobuněčném umístění naznačuje, že v cytoplasmě je spousta fosforylovaného a neaktivního FOXO připraveného na aktivaci. Za defosforylaci FOXO na PKB/Akt a SGK místech jsou zodpovědné proteinfosfatasy. Tyto fosfatasy zatím nejsou zcela charakterizovány.<sup>[14]</sup>

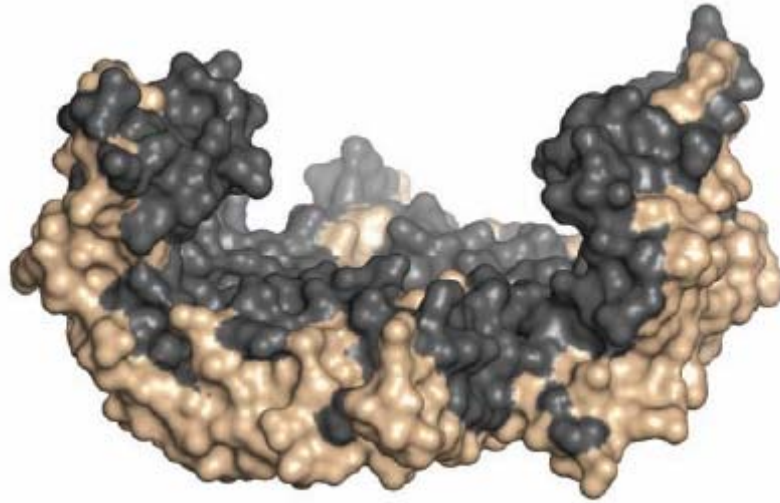
### 2.3.3.2 Proteiny 14-3-3

Proteiny 14-3-3 jsou rodinou kyselých regulačních proteinů, které můžeme nalézt ve všech eukaryotických organismech. Proteiny 14-3-3 ovlivňují strukturu svých vazebných partnerů.<sup>[11]</sup> Netypické jméno těchto proteinů, 14-3-3, je odvozeno od jejich elučních a migračních stop při dvojdimenzionální DEAE-celulózové chromatografii a elektroforéze ve škrobovém gelu.<sup>[11]</sup>

Proteiny 14-3-3 jsou vysoce konzervované v širokém spektru eukaryotických druhů. Mnoho organismů exprimuje různé isoformy. U člověka bylo dosud identifikováno sedm různých isoform, které jsou označovány malými písmeny řecké abecedy. Prvotní strukturální studie potvrdily dimerní povahu proteinů 14-3-3. Uprostřed

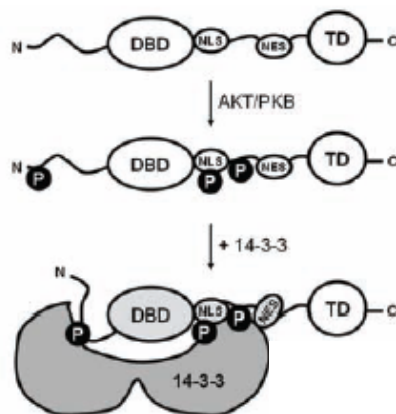


dimeru proteinu 14-3-3 se nachází 4 nm-široký kanál obsahující dva amfipatické žlábký.<sup>[11]</sup> Znárodnění povrchu dimeru 14-3-3 je na obr. 2.3.



**Obr. 2.3** Struktura lidské  $\zeta$  isoformy proteinu 14-3-3 (zobrazení povrchu). Tmavě šedě jsou zbarveny sekvence aminokyselinových zbytků, které jsou plně konzervovány u všech lidských isoformem.<sup>[11]</sup>

Jednou ze skupin vazebných partnerů proteinů 14-3-3 jsou FOXO transkripční faktory. Schéma primární struktury FOXO je na obr. 2.4. Fosforylace enzymem PKB/Akt na fosforylačních místech na N-konci a ve forkhead doméně FOXO proteinů vytváří dva vazebné motivy pro 14-3-3 a způsobuje navázání FOXO proteinu na dimer 14-3-3. Tyto dva motivy sousedí s DNA vazebnou doménou, čímž roste pravděpodobnost, že se proteiny 14-3-3 mohou účastnit přerušování vazby mezi FOXO a DNA. Tato inhibice vazby na DNA, která je závislá na proteinu 14-3-3, byla pozorována u DAF-16 a FOXO4. Dalším důležitým následkem spojení FOXO faktorů s proteinem 14-3-3 je urychlený transport komplexů FOXO–14-3-3 ven z jádra a jejich zadržení v cytoplasmě.<sup>[11]</sup>



**Obr. 2.4** Schéma primární struktury FOXO proteinů. Všechny FOXO proteiny mají stejnou organizaci domén a obsahují forkhead DNA-vazebnou doménu (DBD), jaderný lokalizační signál (NLS), jadernou exportní sekvenci (NES) a transaktivační doménu (TD). PKB/Akt fosforylační místa jsou označena černými kolečky.<sup>[11]</sup>

### 2.3.3.3 Odpověď na oxidativní stres

#### Fosforylace enzymy MST1 a JNK1

Stresové stimuly spouštějí transport FOXO proteinů do jádra, přičemž zajímavé je, že se tak děje i v přítomnosti růstových faktorů. Toto pozorování naznačuje, že oxidativní stres může FOXO proteinům umožnit vstup do jádra i bez defosforylace na místech fosforylovaných enzymy PKB/Akt a SGK. Proteinkinasa MST1 v odpovědi na oxidativní stres skutečně fosforyluje FOXO3 na Ser207, konzervovaně lokalizovaném v DNA-vazebné doméně. Fosforylace FOXO3 enzymem MST1 přeruší vazbu s 14-3-3 a tím spustí transport FOXO3 z cytoplasmy do jádra. Další stresem aktivovaná proteinkinasa JNK1 fosforyluje FOXO4 na Thr447 a Thr451 a spouští transport členů rodiny FOXO z cytoplasmy do jádra. JNK1 také fosforyluje proteiny 14-3-3, což pomáhá uvolnit FOXO faktory z jejich komplexu s 14-3-3. Takže oxidativním stresem aktivovaná JNK1 dráha působí zcela opačně k PI3K-PKB/Akt, SGK dráze aktivované insulinem a růstovými faktory.<sup>[14]</sup>

## **Monoubiquitinace**

Ubiquitin je malý, vysoce konzervovaný regulační protein. Stimuly oxidativního stresu spouštějí transport FOXO4 do jádra a následnou aktivaci transkripce, která je závislá na monoubiquitinaci FOXO4 na Lys199 a Lys211.<sup>[14]</sup>

## **Acetylace**

Při oxidativním stresu je FOXO acetylován. Acetylace ovlivňuje vnitrobuněčnou lokalizaci FOXO. Zvyšuje lokální koncentraci FOXO v těch částech jádra, které jsou hustě zaplněné proteiny regulující funkci FOXO.<sup>[14]</sup>

## **2.3.4 Funkce FOXO**

Zástupci třídy "O" forkhead transkripčních faktorů hrají důležitou roli v regulaci metabolismu, buněčné proliferace, tolerance vůči stresu a pravděpodobně i délky života. Aktivita FOXO faktorů je přísně kontrolována posttranslačními modifikacemi zahrnujícími kromě PKB/Akt-zprostředkované fosforylace, též fosforylaci jinými proteinkinasami, acetylaci a ubiquitinaci. Zvýšený buněčný oxidativní stres reguluje mnoho z těchto posttranslačních modifikací FOXO a naopak aktivita FOXO reguluje buněčnou odolnost vůči oxidativnímu stresu. Z toho důvodu se zdá, že FOXO transkripční faktory a oxidativní stres jsou navzájem složitě propojeny. Tato souvislost mezi oxidativním stresem a FOXO faktory má zvláštní význam s ohledem na možnou roli FOXO faktorů v ovlivnění délky života a vzniku různých onemocnění. Předpokládá se, že stárnutí je výsledkem poškození buněk a organismu vyvolané kumulativním působením kyslíkových radikálů.<sup>[15]</sup>

### 3 CÍLE PRÁCE

- Exprese a purifikace DNA-vazebné domény lidského forkhead transkripčního faktoru FOXO4 (sekvence 82-207).
- Určení disociační konstanty komplexů DNA-vazebné domény FOXO4 a tří různých Flc-dsDNA (s různým obsahem A-T párů) pomocí změn stacionární anisotropie fluorescence.

## 4 MATERIÁLY A METODY

### 4.1 Použitý materiál

#### 4.1.1 Chemikálie

2-thioethanol .....	Carl Roth (Německo)
ampicilin .....	Sigma (USA)
APS .....	Sigma (USA)
azid sodný .....	Sigma (USA)
bromfenolová modř.....	Aldrich (Německo)
citrát sodný.....	Spolek pro chemickou a hutní výrobu (Československo)
Coomassie Brilliant Blue R 250 .....	Lachema a.s. (Česká republika)
dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného.....	Lachema a.s. (Česká republika)
dihydrogenfosforečnan draselný.....	Lachema a.s. (Česká republika)
DTT.....	Carl Roth (Německo)
EDTA.....	Carl Roth (Německo)
glycerol .....	Lachema a.s. (Česká republika)
glycin .....	Carl Roth (Německo)
hydroxid sodný .....	Lach-Ner, s.r.o. (Česká republika)
chlorid draselný.....	Lachema a.s. (Česká republika)
chlorid sodný.....	Carl Roth (Německo)
imidazol .....	Carl Roth (Německo)
IPTG.....	Sigma (USA)
isopropanol.....	Lachema a.s. (Česká republika)
kyselina chlorovodíková .....	Lachema a.s. (Česká republika)
kyselina octová .....	Lachema a.s. (Česká republika)
LB médium .....	Carl Roth (Německo)

lysozym.....	Carl Roth (Německo)
methanol.....	Lachema a.s. (Česká republika)
PMSF .....	Sigma (USA)
Rotiphorese Gel 30 (směs akrylamidu a bisakrylamidu v poměru 37,5 : 1).....	Carl Roth (Německo)
SDS .....	Sigma (USA)
TEMED.....	Carl Roth (Německo)
thrombin.....	Sigma (USA)
Tris .....	Carl Roth (Německo)

### 4.1.2 Přístroje

Centrifuga 5804 R (rotor A-4-44) .....	Eppendorf (Německo)
Centrifuga K80 (rotor S6/6,6) .....	MLW (Německo)
FPLC AKTA .....	Amersham Biosciences (Švédsko)
inkubátor HT Multitron.....	Infors (Švýcarsko)
peristaltická pumpa .....	Ismatec (Švýcarsko)
sonikátor Sonicator3000 Misonix .....	Cole-Parmer (USA)
spektrofluorimetr Photon Counting	
Spektrofluorimetr PC1 .....	ISS (USA)
spektrofotometr Agilent 8453 .....	Agilent (USA)
vertikální polyakrylamidová elektroforéza .....	BioRad (USA)
Vortex Zx3 .....	Velp Scientifica (Itálie)

### 4.1.3 Ostatní

automatické pipety .....	Eppendorf (Německo)
benzamidin-sepharosa.....	Amersham Biosciences (Švédsko)
centrifugační zkumavky .....	Carl Roth (Německo)
Chelating Sepharose Fast Flow.....	GE Healthcare (Švédsko)

dialyzační membrána (typ 27/32) .....	Carl Roth (Německo)
<i>E. coli</i> kmen BL21(DE3) .....	Stratagene (USA)
filtry SPARTAN 13/0,45 RC .....	Whatman (Německo)
kolona Superdex 75 (10/300 GL).....	Amersham Biosciences (Švédsko)
koncentrátory Amicon Ultra .....	Millipore (USA)
křemenné kyvety .....	Agilent (USA)
laboratorní sklo .....	Simax (Česká republika)
magnetická míchačka Variomag Maxi, Komet...	Thermo Scientific (USA)
mikrozkumavky .....	P-Lab, a.s. (Česká republika)
nylonové filtry (0,45 µm).....	Whatman (Německo)
pH metr JenWay 3505 .....	Felsted (Velká Británie)
Precision Plus Protein Dual Color Standard.....	BioRad (USA)
SP sepharose .....	Amersham Biosciences (Švédsko)
stříkačky .....	B. Braun (Německo)
špičky na automatické pipety .....	Axygen (USA)

## 4.2 Exprese FOXO4 82–207

Bylo připraveno 12 miniprepů (5 ml sterilního Luria-Bertani (LB) média s ampicilinem o finální koncentraci 100 µg ml<sup>-1</sup>) s bakteriální kulturou buněk *E. coli* BL21(DE3) obsahující plasmid pET15b se zaklonovaným genem FOXO4 (sekvence 82–207). Tyto miniprepy byly inkubovány přes noc při 37 °C a konstantním třepání 200 rpm. Následně bylo připraveno 6 × 1 l sterilního LB média temperovaného na laboratorní teplotu. Do každé láhve s LB médiem byl přidán ampicilin o finální koncentraci 100 µg ml<sup>-1</sup> a přeneseny dva miniprepy s narostlou kulturou. Takto připravené kultury byly dále inkubovány při 37 °C a konstantním třepání 200 rpm až do optické density (OD) 0,69 cm<sup>-1</sup> měřené při vlnové délce 600 nm. Poté byl přidán induktor IPTG o finální koncentraci 0,5 mmol dm<sup>-3</sup>, který spustil proteosyntézu, a kultury byly přes noc inkubovány při 20 °C a konstantním třepání 200 rpm. Další den byly kultury centrifugovány při 4 °C a 3400 rpm po dobu 30 minut. Pelety obsahující

bakterie byly resuspendovány v lyzačním pufru a bylo k nim přidáno 28 mg lysozymu a 2,5 ml 100 mM roztoku inhibitoru proteas PMSF v ethanolu (výsledná koncentrace  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ). Buňky byly sonikovány celkem 20 minut (při výkonu 45 W). Po sonikaci následovala centrifugace při  $4^\circ\text{C}$  a 13500 rpm po dobu 1 hodiny. Po centrifugaci byl protein obsažen v supernatantu (cytosolární frakce) a byl připraven k purifikaci.

#### **Složení 10× PBS pufru**

<u>látka</u>	<u>odměřené množství</u>
NaCl	80 g
KCl	2 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,4 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	14,4 g
$\text{NaN}_3$	0,4 g

doplněno ultra-čistou vodou do objemu 1 l

pH upraveno na hodnotu 7,4 pomocí 10 M NaOH

#### **Složení lyzačního pufru**

<u>látka</u>	<u>výsledná koncentrace</u>	<u>odměřené množství</u>
PBS	1×	10 ml 10× PBS
NaCl	$1 \text{ mol dm}^{-3}$	5,84 g
$\beta\text{ME}$	$4 \text{ mmol dm}^{-3}$	27,8 $\mu\text{l}$
imidazol	$2 \text{ mmol dm}^{-3}$	0,027 g
PMSF	$1 \text{ mmol dm}^{-3}$	1 ml 100 mM PMSF v ethanolu

doplněno ultra-čistou vodou do objemu 100 ml



## 4.3 Purifikace FOXO4 82–207

### 4.3.1 Niklová chelatační chromatografie

Niklová chelatační chromatografie je metoda umožňující purifikaci proteinů obsahující tzv. His-tag (motiv šesti histidinů). Využívá se zde možnosti koordinačního navázání histidinu na nikelnaté ionty. His-tag může být cíleně připojen na jeden z konců proteinu a tento mírně modifikovaný protein se pak selektivně váže na  $\text{Ni}^{2+}$  zachycené na nosiči v koloně.

Niklová chelatační chromatografie byla provedena na koloně obsahující Chelating Sepharose Fast Flow. Kolona byla promyta v tomto pořadí 10 ml destilované vody, 10 ml regeneračního roztoku, 15 ml destilované vody, 50 ml 0,1 M roztoku  $\text{NiSO}_4$ , 10 ml destilované vody a 10 ml pufru E pro niklovou chelatační chromatografii. Poté byl na kolonu nanesen roztok proteinu FOXO4 obsahující His-tag. Po zachycení proteinu na koloně byla kolona promyta nejprve 20 ml pufru E pro niklovou chelatační chromatografii a poté 250 ml 10% (v/v) pufru F v pufru E pro niklovou chelatační chromatografii. Protein byl eluován čistým pufrem F pro niklovou chelatační chromatografii. Frakce proteinu byly jímány do mikrozkušavek po 1,5 ml.

#### Složení regeneračního roztoku

<u>látka</u>	<u>výsledná koncentrace</u>
EDTA	$50 \text{ mmol dm}^{-3}$
NaCl	$0,5 \text{ mol dm}^{-3}$

### **Složení pufru E pro niklovou chelatační chromatografii**

<u>látka</u>	<u>výsledná koncentrace</u>	<u>odměřené množství</u>
PBS	1×	50 ml 10× PBS
NaCl	0,5 mol dm <sup>-3</sup>	14,6 g
βME	2 mmol dm <sup>-3</sup>	70 μl
imidazol	1 mmol dm <sup>-3</sup>	0,035 g

doplněno ultra-čistou vodou do objemu 0,5 l

Složení PBS pufru viz strana 24.

### **Složení pufru F pro niklovou chelatační chromatografii**

<u>látka</u>	<u>výsledná koncentrace</u>	<u>odměřené množství</u>
PBS	1×	50 ml 10× PBS
NaCl	0,5 mol dm <sup>-3</sup>	14,6 g
βME	2 mmol dm <sup>-3</sup>	70 μl
Imidazol	0,6 mol dm <sup>-3</sup>	20,4 g

doplněno ultra-čistou vodou do objemu 0,5 l  
pH upraveno na hodnotu 8,0 pomocí koncentrované HCl

Složení PBS pufru viz strana 24.

## **4.3.2 Dialýza**

Dialýza je proces, při kterém lze látky od sebe oddělit na základě velikosti jejich molekul. K tomu se používá polopropustná membrána, která se naplní např. roztokem proteinu, jehož molekuly jsou větší než póry membrány. Protein (makromolekula) zůstane uvnitř dialyzační membrány, zatímco molekuly o velikosti menší než jsou póry membrány difundují ve směru koncentračního gradientu přes membránu do dialyzačního pufru. Po dialýze je tedy protein rozpuštěn v použitém dialyzačním pufru.

Byla použita dialyzační membrána s póry odpovídající přibližně velikosti proteinu o relativní molekulové hmotnosti 14000.

### **Složení dialyzačního pufru**

<u>látk</u>	<u>výsledná koncentrace</u>	<u>odměřené množství</u>
citrát sodný	50 mmol dm <sup>-3</sup>	17,4 g
EDTA	2 mmol dm <sup>-3</sup>	4 ml 0,5 M EDTA
DTT	2 mmol dm <sup>-3</sup>	0,31 g

doplněno ultra-čistou vodou do objemu 1 l  
pH upraveno na hodnotu 6,3 pomocí koncentrované HCl

### **4.3.3 Kationtově výměnná chromatografie**

Kationtově výměnná chromatografie se provádí na koloně, která obsahuje na chemicky inertním nosiči elektrostaticky vázané kationty, které mohou být reversibilně vyměňovány za kationty z protékajícího roztoku. Při purifikaci proteinů touto metodou je nutné pracovat s pufrem, jehož pH je nižší než pI purifikovaného proteinu (potom má protein kladný náboj).

Před kationtově výměnnou chromatografií byl protein FOXO4 rozpuštěn v dialyzačním pufru, jehož pH bylo nastaveno na hodnotu 6,3. Při tomto pH je protein FOXO4 ve formě kationtu. Teoretická hodnota pI proteinu FOXO4 82–207 je 10,53. Kolona pro kationtově výměnnou chromatografii obsahující 5 ml SP sepharosy byla ekvilibrována pufrem E pro kationtově výměnnou chromatografii. Po zachycení proteinu FOXO4 na koloně a vymytí proteinů, které se na koloně nevázaly, byl protein FOXO4 eluován gradientem iontové síly. Gradientu iontové síly bylo dosaženo kontinuálním přimícháváním pufru F do E pro kationtově výměnnou chromatografii až do 50% (v/v) obsahu pufru F v pufru E.

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

<u>látk</u>	<u>výsledná koncentrace</u>	<u>odměřené množství</u>
citrát sodný	50 mmol dm <sup>-3</sup>	17,4 g
EDTA	1 mmol dm <sup>-3</sup>	2 ml 0,5 M EDTA
DTT	2 mmol dm <sup>-3</sup>	0,31 g

doplněno ultra-čistou vodou do objemu 1 l  
pH upraveno na hodnotu 6,3 pomocí koncentrované HCl

### **Složení pufru F pro kationtovou výměnnou chromatografií**

<u>látka</u>	<u>výsledná koncentrace</u>	<u>odměřené množství</u>
citrát sodný	50 mmol dm <sup>-3</sup>	17,4 g
EDTA	1 mmol dm <sup>-3</sup>	2 ml 0,5 M EDTA
DTT	2 mmol dm <sup>-3</sup>	0,31 g
NaCl	1 mol dm <sup>-3</sup>	58,4 g

doplněno ultra-čistou vodou do objemu 1 l

pH upraveno na hodnotu 6,3 pomocí koncentrované HCl

#### **4.3.4 Určení koncentrace**

Koncentrace fúzního proteinu ve vzorku byla určena metodou měření absorbance. Absorbance byla měřena při vlnové délce 280 nm a jako referentní roztok byl použit čistý pufr, v kterém byl protein rozpuštěn. Koncentrace byla počítána z Lambertova-Beerova zákona a molární absorpční koeficient byl určen z primární sekvence proteinu pomocí programu ProtParam na [www.expasy.org](http://www.expasy.org).

#### **4.3.5 Štěpení thrombinem**

K 16 mg fúzního proteinu FOXO4 bylo přidáno 60 U thrombinu (3,75 U thrombinu na 1 mg fúzního proteinu) k odštěpení His-tagu. Štěpení probíhalo přes noc při 4 °C. Thrombin byl posléze odstraněn na koloně obsahující benzamidin sepharosu. Kolona byla ekvilibrována puftrem pro gelovou permeační chromatografií (složení viz strana 29), poté byl na kolonu nanesen roztok proteinu s thrombinem. Thrombin byl zachycen na koloně a protein byl z kolony vymyt puftrem pro gelovou permeační chromatografií.

### 4.3.6 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie je metoda dělení látek podle hydrodynamického objemu jejich molekul. Provádí se na aparaturách obsahujících jednu nebo více kolon naplněných zrnitým porézním gelem. Při gelové permeační chromatografii jsou molekuly látek obsažených v roztoku distribuovány mezi rozpouštědlo vně částic gelu a rozpouštědlo uvnitř těchto částic. Molekuly, které svou velikostí převyšují velikost pórů gelu, procházejí prostorem mezi částicemi gelu a jsou eluovány v nejkratším čase. Naopak molekuly, kterým jsou přístupné všechny póry částic gelu, jsou na koloně zadržovány nejdéle.

Před vlastní gelovou permeační chromatografií byl roztok proteinu v pufru pro gelovou permeační chromatografii zkoncentrován na objem 2 ml a přefiltrován pomocí filtru s póry o velikosti 0,45  $\mu\text{m}$ . Gelová permeační chromatografie byla provedena na koloně Superdex 75 (10/300 GL), která byla ekvilibrována puftrem pro gelovou permeační chromatografii.

#### Složení pufru pro gelovou permeační chromatografii

<u>látka</u>	<u>výsledná koncentrace</u>	<u>odměřené množství</u>
Tris/HCl, pH 7,5	20 mmol $\text{dm}^{-3}$	20 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,5
NaCl	150 mmol $\text{dm}^{-3}$	8,77 g
EDTA	1 mmol $\text{dm}^{-3}$	2 ml 0,5 M EDTA
glycerol	10 % (w/v)	100 g
doplněno ultra-čistou vodou do objemu 1 l		

### 4.3.7 SDS–PAGE

Při elektroforetických metodách se nabitě částice pohybují v elektrickém poli. Jejich rychlost je přímo úměrná velikosti jejich náboje a nepřímo úměrná velikosti částic. Při elektroforéze prováděné v gelu se částice navíc dělí i gelovou filtrací, přičemž je rychlost průchodu částic gelem určena velikostí a tvarem částic. Pro dělení

proteinů podle jejich velikosti a potažmo i molekulové váhy se používá metoda SDS–PAGE, což je označení pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti detergentu dodecylsírany sodného (SDS). SDS je silná povrchově aktivní látka, která denaturuje proteiny (rozruší jejich terciární strukturu), naváže se na ně a tím překryje jejich nativní (přirozený) náboj a přidělí jim záporný náboj odvislý od velikosti proteinu. Velikost tohoto záporného náboje je určitým násobkem velikosti proteinu, a jelikož je tento násobek pro všechny proteiny stejný, tak se proteiny nedělí na základě jejich elektroforetické pohyblivosti, ale pouze gelovou filtrací, a elektrické pole zde působí jen jako hnací síla pohybu částic. Při gelové filtraci v polyakrylamidovém gelu větší částice zaostávají za menšími, jelikož se setkávají s větším odporem při průchodu póry gelu.

Elektroforéza SDS–PAGE byla provedena po každém purifikačním kroku pro zjištění přítomnosti proteinu a případných degradačních produktů v jednotlivých frakcích. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 200 V. Byl použit 15% separační a 5% zaváděcí polyakrylamidový gel.

### **Příprava vzorků**

Z každé frakce předchozího purifikačního kroku byl odebrán vzorek proteinu do mikrozkuhavky, k proteinu byl přidán SDS vzorkový pufr a směs byla inkubována 1 minutu při teplotě 100 °C, čímž proběhla denaturace proteinu.

Do prvního žlábků byl vždy nanesen standard molekulových hmotností Precision Plus Protein Dual Color Standard obsahující směs fragmentů o relativních hmotnostech  $250 \cdot 10^3$ ,  $150 \cdot 10^3$ ,  $100 \cdot 10^3$ ,  $75 \cdot 10^3$ ,  $50 \cdot 10^3$ ,  $37 \cdot 10^3$ ,  $25 \cdot 10^3$ ,  $20 \cdot 10^3$ ,  $15 \cdot 10^3$  a  $10 \cdot 10^3$ .

### **Složení SDS vzorkového pufru**

<u>látka</u>	<u>odměřené množství</u>
1 M Tris/HCl, pH 6,8	0,6 ml
50% (w/v) glycerol	5 ml
10% (w/v) SDS	2 ml
βME	0,5 ml
1% (w/v) bromfenolová modř	1 ml
ultra-čistá voda	0,9 ml

### **Složení separačního gelu**

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

### **Složení pufru pro separační gel**

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

doplněno ultra-čistou vodou do objemu 100 ml

### **Složení zaváděcího gelu**

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

### **Složení pufru pro zaváděcí gel**

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

doplněno ultra-čistou vodou do objemu 100 ml

### **Složení elektroforetického pufru**

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

### **Vizualizace gelu**

Gely byly po ukončení SDS–PAGE inkubovány 15 minut v barvicím roztoku Coomassie Brilliant Blue R 250 při teplotě 70 °C, čímž byly zviditelněny proteiny v gelu. Poté byly gely odbarveny inkubací po dobu 30 minut v odbarvovacím roztoku při teplotě 70 °C, přičemž proteiny zůstaly obarveny.

### **Složení barvicího roztoku**

<u>látka</u>	<u>odměřené množství</u>
Coomassie Brilliant Blue R 250	1 g
methanol	450 ml
kyselina octová	100 ml
doplněno ultra-čistou vodou do objemu 1 l	

### **Složení odbarvovacího roztoku**

<u>látka</u>	<u>odměřené množství</u>
methanol	100 ml
kyselina octová	100 ml
doplněno ultra-čistou vodou do objemu 1 l	

## **4.4 Měření DNA vazebné afinity FOXO4 82–207 pomocí změn stacionární anisotropie fluorescence**

Fluorescence je spinově dovolený zářivý přechod, obvykle z rovnovážné vibrační hladiny stavu  $S_1$  do některé z vibračních hladin základního stavu  $S_0$ . Pokud látka absorbuje světelné kvantum budícího záření, přecházejí elektrony ze singletového stavu  $S_0$  do excitovaných singletových stavů  $S_1, S_2, \dots$  a tripletových stavů  $T_1, T_2, \dots$ . Molekula obvykle přejde z rovnovážné vibrační hladiny stavu  $S_0$  do některé z vibračních hladin excitovaných stavů. K deexcitaci molekuly dochází buď zářivými přechody (fluorescence, fosforescence) nebo nezářivými přechody (vibrační relaxace, mezisystémový přechod).

Jestliže je excitační záření polarizované, pak i emitované záření (fluorescence) je polarizované. Polarizace fluorescence je způsobena selektivní absorpcí polarizovaného



excitačního záření molekulami, jejichž dipóly jsou orientovány ve stejném směru jako rovina polarizace dopadajícího záření. Ke kvantifikaci polarizace fluorescence se používá veličina stacionární anisotropie fluorescence ( $r_s$ ) definovaná vztahem

$$r_s = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}, \quad (1)$$

kde  $I_{\parallel}$  značí intenzitu emisního záření orientovaného paralelně k rovině polarizace excitačního záření a  $I_{\perp}$  značí intenzitu emisního záření orientovaného kolmo k rovině polarizace excitačního záření.<sup>[16]</sup>

Polarizované emisní záření však může být řadou jevů depolarizováno. Mezi nejčastější příčiny snížení hodnoty anisotropie se řadí rotační difúze fluoreskujících molekul. Tato difúze je ovlivňována jejich velikostí a tvarem, ale také viskozitou prostředí. Měření stacionární anisotropie fluorescence tak umožňuje studium řady biochemických procesů, např.: denaturaci proteinů či asociační (afinitní) rovnováhu mezi proteinem a ligandem.<sup>[16]</sup>

V této práci byla stacionární anisotropie fluorescence využita ke studiu vazebné afinity FOXO4 82–207 k DNA.

#### 4.4.1 Příprava Flc-dsDNA z oligonukleotidů

**Použité oligonukleotidy** (tučně je označen tzv. core motiv)

Flc-DNA 1: Flc- 5'-CTATGT**AAACAAC**-3'

DNA 1: 3'-GATACAT**TTTGTTG**-5'

Flc-DNA 2: Flc- 5'-AAAAAT**AAACAAC**-3'

DNA 2: 3'-TTTTTAT**TTTGTTG**-5'

Flc-DNA 3: Flc- 5'-CGCGGT**AAACAAC**-3'

DNA 3: 3'-GCGCCAT**TTTGTTG**-5'

Všechny oligonukleotidy byly rozpuštěny v ultra-čisté vodě a zředěny na koncentraci  $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$ . Oligonukleotidy byly míchány v ekvivalentním množství ( $50 \mu\text{l}$ ) a to vždy oligonukleotid značený fluoresceinem (Flc-DNA) s nezačleněným komplementárním oligonukleotidem (DNA). Ke každé směsi oligonukleotidů bylo přidáno  $2,5 \mu\text{l}$  1 M roztoku NaCl (výsledná koncentrace byla  $25 \text{mmol dm}^{-3}$ ). Směsi byly zahřáty k varu na vodní lázni a poté byly nechány pomalu zchladnout. Výsledná koncentrace každé Flc-dsDNA byla  $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ . Mikrozkušavky obsahující DNA značenou fluoresceinem byly chráněny před světlem.

#### 4.4.2 Měření stacionární anisotropie fluorescence

Do kyvety pro měření stacionární anisotropie fluorescence byl napipetován 1 ml pufru pro měření stacionární anisotropie fluorescence a dále  $2 \mu\text{l}$   $50 \mu\text{M}$  Flc-dsDNA (finální koncentrace  $0,1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ). Protein FOXO4 82–207 byl do kyvety titrován. Měření fluorescence bylo provedeno při excitační vlnové délce 494 nm a emisní vlnové délce 520 nm. Stacionární anisotropie fluorescence ( $r_s$ ) byla počítána z intenzit fluorescence podle vztahu č. 1.

##### Složení pufru pro měření stacionární anisotropie fluorescence

<u>látka</u>	<u>výsledná koncentrace</u>	<u>odměřené množství</u>
Tris/HCl, pH 7,5	$20 \text{mmol dm}^{-3}$	$800 \mu\text{l}$ 1 M Tris/HCl, pH 7,5
NaCl	$100 \text{mmol dm}^{-3}$	$800 \mu\text{l}$ 5 M NaCl
doplněno ultra-čistou vodou do objemu 40 ml		

### 4.4.3 Vyhodnocení výsledků měření

Frakce molekul Flc-dsDNA navázaná na FOXO4 ( $F_B$ ) byla počítána podle vztahu

$$F_B = \frac{r_{\text{obs}} - r_{\text{min}}}{(r_{\text{max}} - r_{\text{obs}})Q + (r_{\text{obs}} - r_{\text{min}})}, \quad (2)$$

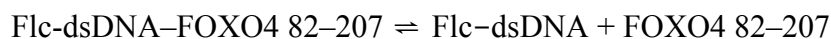
kde  $r_{\text{obs}}$  je pozorovaná anisotropie při určité koncentraci FOXO4,  $r_{\text{min}}$  je minimální pozorovaná anisotropie v nepřítomnosti FOXO4,  $r_{\text{max}}$  je anisotropie v saturaci a  $Q$  je korekce na změnu kvantového výtěžku fluoresceinu během vazby Flc-dsDNA na FOXO4. Parametr  $Q$  byl vypočítán podle vztahu

$$Q = \frac{I_{\text{obs}}}{I_0}, \quad (3)$$

kde  $I_{\text{obs}}$  je pozorovaná celková intenzita fluorescence při určité koncentraci FOXO4 a  $I_0$  je počáteční celková intenzita fluorescence změřená v nepřítomnosti FOXO4. Získaná závislost  $F_B$  na relativní koncentraci FOXO4 82–207 ( $c_{\text{rel, FOXO4 82-207}}$ ) byla proložena následující rovnicí

$$F_B = \frac{K_D + c_{\text{rel, dsDNA}} + c_{\text{rel, FOXO4 82-207}} - \sqrt{(K_D + c_{\text{rel, dsDNA}} + c_{\text{rel, FOXO4 82-207}})^2 - 4c_{\text{rel, dsDNA}} c_{\text{rel, FOXO4 82-207}}}}{2c_{\text{rel, dsDNA}}}, \quad (4)$$

kde  $K_D$  je disociační konstanta rovnováhy



a  $c_{\text{rel, dsDNA}}$  je relativní koncentrace Flc-dsDNA.  $c_{\text{rel, dsDNA}}$  byla pevně nastavena na hodnotu  $0,1 \cdot 10^{-6}$ .

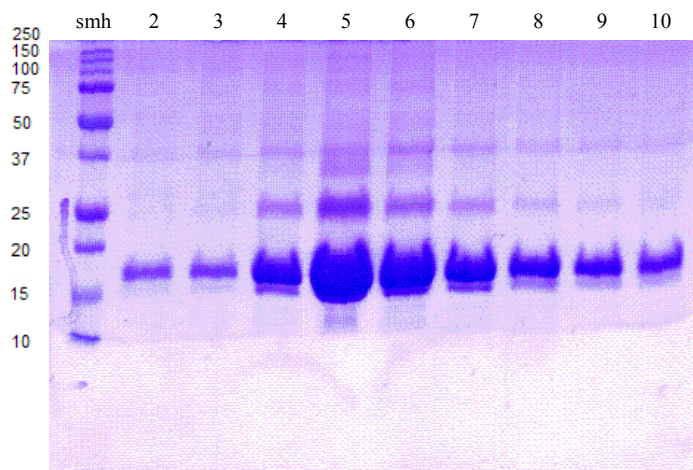
## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Purifikace FOXO4 82–207

Prvním cílem této bakalářské práce byla exprese a purifikace DNA-vazebné domény transkripčního faktoru FOXO4. Hlavními kroky purifikace proteinu FOXO4 82–207 byly niklová chelatační chromatografie, kationtově výměnná chromatografie a gelová permeační chromatografie provedené v tomto pořadí. Po každém z těchto kroků byla provedena 15% (w/v) SDS–PAGE k určení přibližného množství proteinu a jeho čistoty v jednotlivých frakcích. Po provedení všech purifikačních kroků byl protein dostatečně vyčištěn a připraven pro měření poskytující informace o vazebné afinitě FOXO4 82–207 k DNA.

#### 5.1.1 Niklová chelatační chromatografie

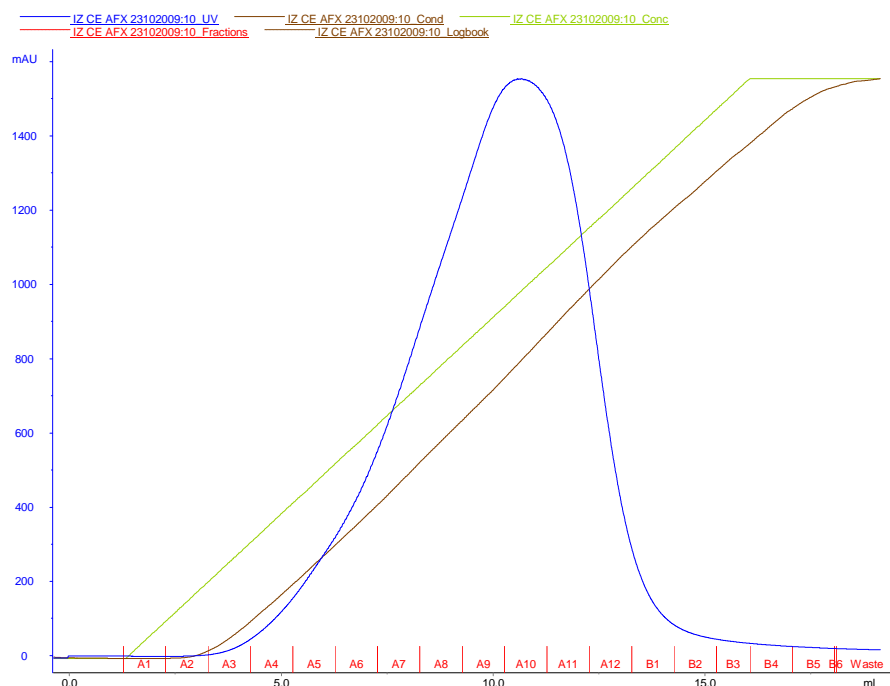
Při eluci při niklové chelatační chromatografii bylo najímáno 10 frakcí po 1,5 ml do mikrozkuvek. Z frakcí 2 – 10 byly odebrány vzorky pro 15% (w/v) SDS–PAGE. Po vizualizaci gelu (obr. 5.1) byly sloučeny frakce 2 – 10. Elektroforéza ukázala, že fúzní protein His-tag-FOXO4 byl exprimován v dostatečném množství. Zdánlivá relativní molekulová hmotnost (~17000) odpovídá očekávané relativní molekulové hmotnosti exprimovaného proteinu (16578). Dále bylo zjištěno, že dochází k mírné proteolytické degradaci proteinu (slabá zóna migrující o něco rychleji než kompletní protein odpovídá degradačnímu produktu).



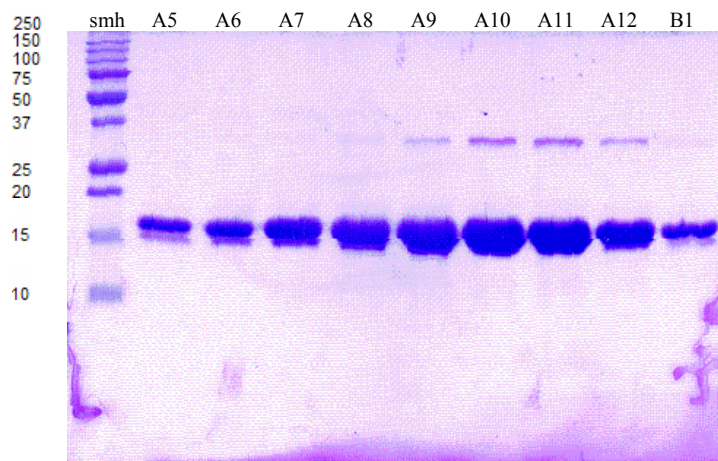
**Obr. 5.1** Vizualizovaný gel po 15% (w/v) SDS–PAGE provedené po niklové chelatační chromatografii. Do první jamky zleva bylo naneseno 12  $\mu$ l standardu molekulových hmotností (relativní molekulová hmotnost jednotlivých fragmentů je vydělena faktorem  $10^3$ ) a do dalších jamek byly naneseny zleva vzorky z frakcí 2 – 10. Vzorky nanášené na gel obsahovaly vždy 5  $\mu$ l roztoku proteinu odebraného z dané frakce po niklové chelatační chromatografii, 5  $\mu$ l SDS vzorkového pufru a 10  $\mu$ l ultra-čisté vody. Celkový objem vzorku nanášeného na gel byl 20  $\mu$ l.

## 5.1.2 Kationtově výměnná chromatografie

Dalším purifikačním krokem byla kationtově výměnná chromatografie. Při eluci (obr. 5.2) byly jímány frakce po 1 ml do mikrozkuhavek. Z frakcí A5 – B1 byly odebrány vzorky pro 15% (w/v) SDS–PAGE. Po vizualizaci gelu (obr. 5.3) byly sloučeny frakce A5 – B1. Z gelu na obr. 5.3 je zřejmé, že došlo ke zlepšení čistoty proteinu. Nicméně stále se nepodařilo odstranit kontaminující protein s relativní molekulovou hmotností  $\sim 30000$ . Proto bylo nutné provést další purifikační krok.



**Obr. 5.2** Záznam průběhu eluce při kationově výměnné chromatografii. Modrá linie značí závislost absorbance při vlnové délce 280 nm na čase. Hnědá linie značí závislost konduktivity na čase. Zelená linie značí teoretický gradient iontové síly. Červenou barvou jsou označeny pozice jímáných frakcí.

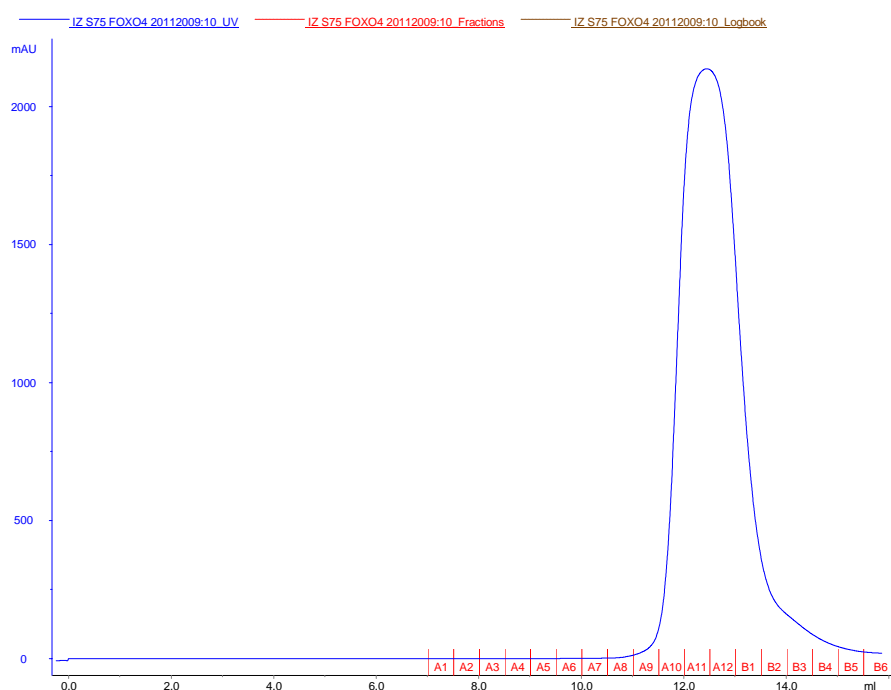


**Obr. 5.3** Vizualizovaný gel po 15% (w/v) SDS-PAGE provedené po kationově výměnné chromatografii. Do první jamky zleva bylo naneseno 12  $\mu$ l standardu molekulových hmotností (relativní molekulová hmotnost jednotlivých fragmentů je vydělena faktorem  $10^3$ ) a do dalších jamek byly naneseny zleva vzorky z frakcí A5 – B1. Vzorky nanášené na gel obsahovaly vždy 5  $\mu$ l roztoku proteinu odebraného z dané frakce po kationově výměnné chromatografii, 5  $\mu$ l SDS vzorkového pufru a 10  $\mu$ l ultračisté vody. Celkový objem vzorku nanášeného na gel byl 20  $\mu$ l.

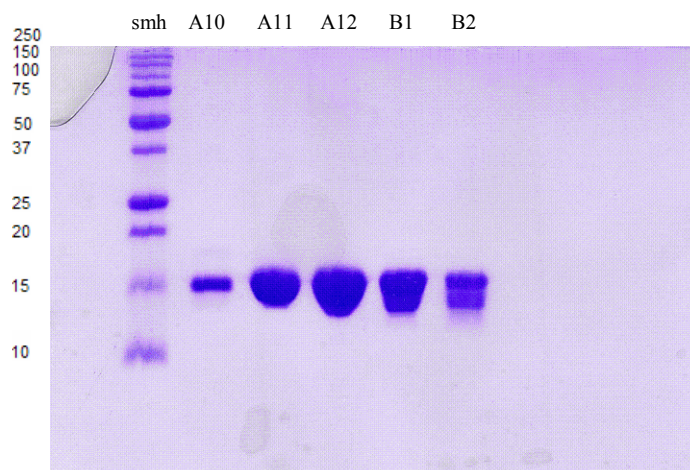
### 5.1.3 Gelová permeační chromatografie

Před provedením gelové permeační chromatografie byl od proteinu FOXO4 odštěpen His-tag (sekvence 6×His) inkubací s thrombinem při 4 °C. Štěpné místo pro thrombin se nachází mezi sekvencí His-tagu a proteinu FOXO4. K roztoku proteinu bylo přidáno 3,75 U thrombinu na 1 mg fúzního proteinu. Thrombin byl následně odstraněn na koloně obsahující benzamidin sepharosu. Následně byla provedena gelová permeační chromatografie.

Při eluci při gelové permeační chromatografii (obr. 5.5) byly jímány frakce po 0,5 ml do mikrozkuvek. Z frakcí A10 – B2 byly odebrány vzorky pro 15% (w/v) SDS–PAGE. Po vizualizaci gelu (obr. 5.6) byly sloučeny frakce A10 a A11, které obsahovaly čistý protein, frakce A12 s malým podílem degradačních produktů byla zachována samostatně a frakce B1 a B2 nebyly dále uchovávány, protože obsahovaly velké množství degradačních produktů, které protein znehodnocují. Bylo dosaženo odstranění proteinu s relativní molekulovou hmotností ~30000.



**Obr. 5.5** Záznam průběhu eluce při gelové permeační chromatografii. Modrá linie značí závislost absorbance při vlnové délce 280 nm na čase. Červenou barvou jsou označeny jímání frakce.



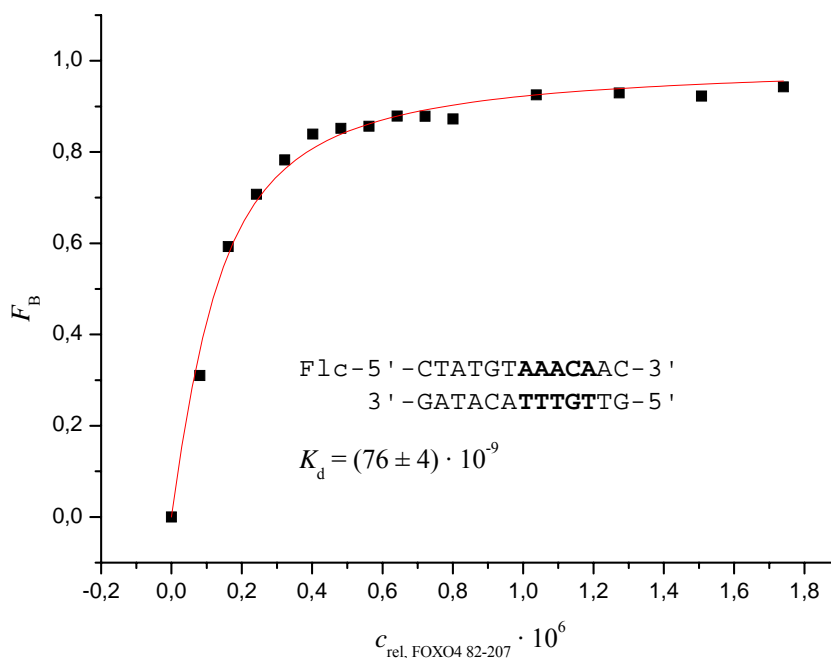
**Obr. 5.6** Vizualizovaný gel po 15% (w/v) SDS–PAGE provedené po gelové permeační chromatografii. Do první jamky zleva bylo nanášeno 12  $\mu$ l standardu molekulových hmotností (relativní molekulová hmotnost jednotlivých fragmentů je vydělena faktorem  $10^3$ ) a do dalších jamek byly nanášeny zleva vzorky z frakcí A10 – B2. Vzorky nanášené na gel obsahovaly vždy 5  $\mu$ l roztoku proteinu odebraného z dané frakce po gelové permeační chromatografii, 2,5  $\mu$ l SDS vzorkového pufru a 5  $\mu$ l ultra-čisté vody. Celkový objem vzorku nanášeného na gel byl 12,5  $\mu$ l.

## 5.2 Měření DNA vazebné afinity FOXO4 82–207 pomocí změn stacionární anisotropie fluorescence

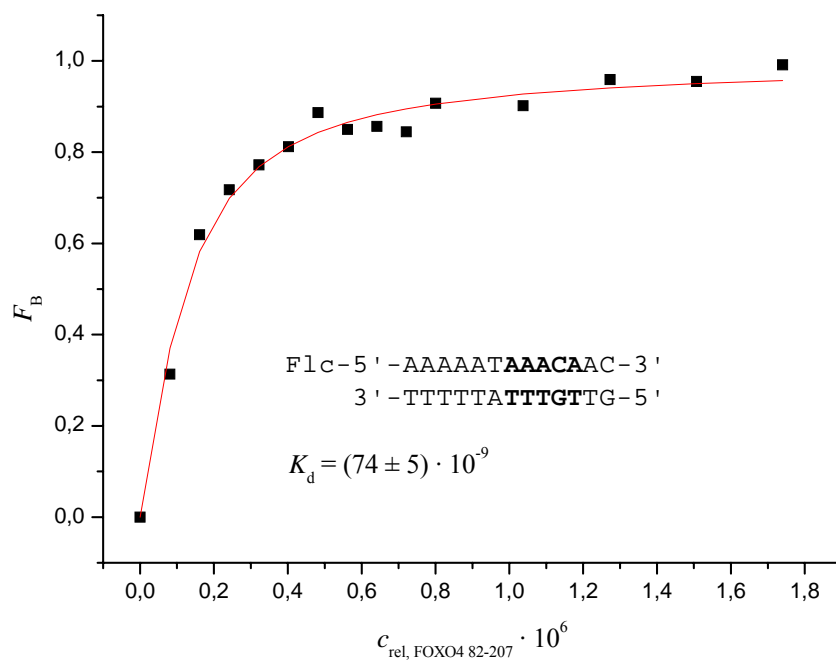
Hlavním cílem této práce bylo zjistit, jestli vazebná afinita DNA-vazebné domény FOXO4 závisí na obsahu A-T párů v oblasti předcházející hlavní vazebný motiv. S tímto místem DNA by měl interagovat ohyb (křídlo) W2 DNA-vazebné domény. Ke stanovení DNA vazebné afinity připravené DNA-vazebné domény FOXO4 byla použita metoda založená na měření změn stacionární anisotropie fluorescence fluoresceinem označených molekul Flc-dsDNA. Na obr. 5.7, 5.8 a 5.9 jsou grafy závislosti  $F_B$  (frakce Flc-dsDNA navázané na FOXO4) na koncentraci FOXO4 pro tři různé typy Flc-dsDNA lišící se sekvencí. Hlavní rozdíl byl v obsahu A-T párů v oblasti předcházející hlavní vazebný motiv. Experimentální hodnoty byly proloženy pomocí rovnice č. 4.



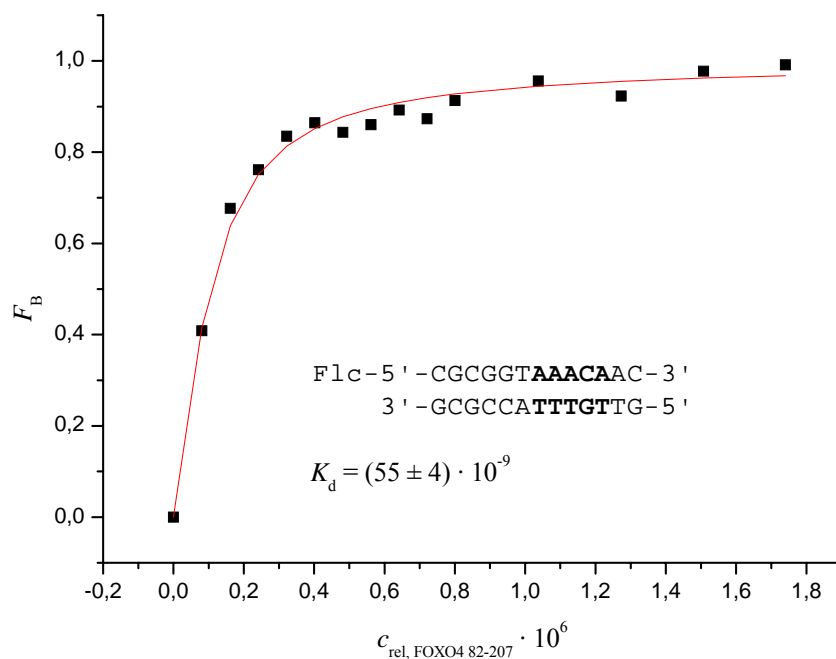
Vazebné studie byly z časových důvodů provedeny pouze jednou, nepočítáme-li optimalizační experimenty. Dále bude nutné tyto vazebné experimenty ještě několikrát opakovat.



**Obr. 5.7** Graf závislosti frakce molekul Flc-dsDNA (#1) navázané na FOXO4 82–207 ( $F_B$ ) na relativní koncentraci FOXO4 82–207 ( $c_{rel, FOXO4 82-207}$ ). V grafu je uvedena hodnota  $K_D$  získaná proložením získaných hodnot rovnicí č. 4. Uvedená chyba je chyba proložení. Sekvence Flc-dsDNA (#1) byla: Flc-5'-CTATGTA**AAACAAC**-3'.



**Obr. 5.8** Graf závislosti frakce molekul F1c-dsDNA (#2) navázané na FOXO4 82–207 ( $F_B$ ) na relativní koncentraci FOXO4 82–207 ( $c_{rel, FOXO4 82-207}$ ). V grafu je uvedena hodnota  $K_D$  získaná proložením získaných hodnot rovnicí č. 4. Uvedená chyba je chyba proložení. Sekvence F1c-dsDNA (#2) byla: F1c-5'-AAAAAATAAACAAC-3'.



**Obr. 5.9** Graf závislosti frakce molekul F1c-dsDNA (#3) navázané na FOXO4 82–207 ( $F_B$ ) na relativní koncentraci FOXO4 82–207 ( $c_{rel, FOXO4 82-207}$ ). V grafu je uvedena hodnota  $K_D$  získaná proložením získaných hodnot rovnicí č. 4. Uvedená chyba je chyba proložení. Sekvence F1c-dsDNA (#3) byla: F1c-5'-CGCGGTAAACAAC-3'.

Ze získaných hodnot  $K_D$  (a také vzhledem k tomu, že vazebné experimenty byly provedeny pouze jednou) není možné říci, že obsah A-T párů má signifikantní vliv na DNA-vazebnou afinitu připravené forkhead domény FOXO4 k testovaným sekvencím F1c-dsDNA.

## 6 DISKUZE

Protein FOXO4 je členem podskupiny "O" forkhead transkripčních faktorů. Zástupci FOXO transkripčních faktorů jsou velmi významné vzhledem k jejich roli v mnoha biologických procesech, jako je např. kontrola metabolismu, buněčné proliferace či ochrany proti oxidativnímu stresu. Předpokládá se také vliv FOXO na délku života.

DNA-vazebná doména FOXO proteinů se váže na sekvence obsahující tzv. hlavní forkhead vazebný motiv 5'-(A/C)AA(C/T)A-3'. Kontakt FOXO s cílovou DNA je zprostředkováván především vodíkovými vazbami mezi aminokyselinami  $\alpha$ -helixu H3 a bazemi nukleotidů ve velkém žlábků DNA. Dalšími oblastmi forkhead domény, které mohou významně interagovat s DNA, jsou ohyby (tzv. křídla) W1 a W2 a N-koncový segment. Tyto oblasti převážně interagují s fosfátovými skupinami cukr-fosfátové kostry molekuly DNA. Úloha ohybu W2 při vazbě na DNA je nejasná. Funkční studie potvrdily, že se na vazbě DNA podílí. Proto byla navržena hypotéza, že ohyb W2 interaguje s oblastí na 5' konci vazebné sekvence, která je bohatá na A-T páry. Předpokládá se, že DNA je v oblastech bohatých na A-T páry více flexibilní. Tato flexibilita by měla usnadňovat interakci s ohybem W2.

Cílem této práce bylo pokusit se zjistit, zda obsah A-T párů v oblasti DNA předcházející hlavnímu vazebnému motivu 5'-(A/C)AA(C/T)A-3', ovlivňuje vazebnou afinitu DNA-vazebné domény FOXO4 k DNA. K měření vazebné afinity byla použita metoda založená na měření změn stacionární anisotropie fluorescence. Bylo provedeno měření se třemi různými Flc-dsDNA značenými na 5' konci fluoresceinem lišícími se obsahem A-T párů v oblasti před hlavním vazebným motivem. Za účelem tohoto měření byla exprimována a purifikována DNA-vazebná doména proteinu FOXO4. Purifikaci bylo dosaženo dostatečné čistoty, ale bohužel se nám nepodařilo zabránit proteolytické degradaci proteinu. Degradace probíhala pravděpodobně od C-konce proteinu. C-konec DNA-vazebné domény FOXO4 obsahuje velké množství kladně nabitých aminokyselin, což způsobuje větší náchylnost tohoto úseku k proteolýze. Tato degradace je nepříznivá především proto, že na C-konci DNA-vazebné domény se nachází právě ohyb W2, jehož vazbou na DNA se tato práce zabývá.

Měření změn stacionární anisotropie fluorescence neukázalo významné rozdíly ve vazebné afinitě FOXO4 k testovaným sekvencím Flc-dsDNA o různém obsahu A-T párů v oblasti předcházející hlavní vazebný motiv. Určené disociační konstanty  $K_D$  jednotlivých komplexů Flc-dsDNA–FOXO4 82–207 nevykazují žádnou tendenci a lze je považovat za přibližně shodné. Hypotéza předpokládající vyšší vazebnou afinitu FOXO4 k DNA bohaté na A-T páry díky usnadnění interakce ohybu W2 s flexibilnější DNA tedy nebyla potvrzena. Tato hypotéza tedy buď neplatí a ohybu W2 interaguje s DNA stejně bez ohledu na množství A-T párů v sekvenci, nebo se nám tuto hypotézu pouze nepodařilo potvrdit. Výsledky měření mohly být ovlivněny degradací DNA-vazebné domény FOXO4, která pravděpodobně probíhala od C-konce a zahrnovala ohyb W2 nebo tím, že k měření byla použita pouze krátká Flc-dsDNA, která nemusí věrně reprezentovat skutečnou DNA obsaženou v lidských buňkách. Dále bude nutné vazebné experimenty ještě několikrát opakovat (z časových důvodů byly vazebné studie provedeny pouze jednou, když nepočítáme optimalizační experimenty).

## 7 ZÁVĚR

- Byla exprimována a purifikována DNA-vazebná doména lidského forkhead traskripčního faktoru FOXO4. Úspěšnost purifikace byla ověřena pomocí metody SDS-PAGE.
- Byly stanoveny vazebné afinity DNA-vazebné domény FOXO4 ke třem různým Flc-dsDNA lišícím se v obsahu A-T párů v oblasti před hlavním vazebným motivem pomocí změn stacionární anisotropie fluorescence. Výsledky měření byly diskutovány.

## 8 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- 1 Clark, K. L., Halay, E. D., Lai, E., Burley, S. K.: Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5, *Nature*, 364, 412–420 (1993)
- 2 Tsai, K. L., Sun, Y. J., Juany, C. Y., Yang, J. Y., Hung, M. C., Hsiao, C. D.: Crystal structure of the human FOXO3a-DBD/DNA komplex suggests the effects of post-translation modification, *Nucleic Acids Research*, 35, 6984–6994 (2007)
- 3 Brent, M. M., Anand, R., Marmorstein, R.: Structural Basis for DNA Recognition by FoxO1 and Its Regulation by Posttranslation Modification, *Structure*, 16, 1407–1416 (2008)
- 4 Weigel, D., Jäckle, H.: The *fork head* Domain: A Novel DNA Binding Motif of Eukaryotic Transcription Factors?, *Cell*, 63, 455–456 (1990)
- 5 Burgering, B. M. T.: A brief introduction to FOXology, *Oncogene*, 27, 2258–2262 (2008)
- 6 Voet, D., Voetová, J. G.: *Biochemie*, Victoria Publishing a.s., Praha (1995)
- 7 Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. E.: *Molecular cell biology*, W. H. Freeman & Co., New York (1999)
- 8 Obsilova, V., Vecer, J., Herman, P., Pabianova, A., Sulc, M., Teisinger, J., Boura, E., Obsil, T.: 14-3-3 Protein Interacts with Nuclear Localization Sequence of Forkhead Transcription Factor FoxO4, *Biochemistry*, 44, 11608–11617 (2005)
- 9 Obsil, T., Obsilova, V.: Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors, *Oncogene*, 27, 2263–2275 (2008)
- 10 van der Heide, L. P., Hoekman, M. F. M., Amidy, M. P.: The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation, *Biochemistry*, 380, 297–309 (2004)
- 11 Obšilová, V., Šilhan, J., Bouřa, E., Teisinger, J., Obšil, T.: 14-3-3 Proteins: A Family of Versatile Molecular Regulators, *Physiological Research*, 57, S11–S21 (2008)

- 12 Boura, E., Silhan, J., Herman, P., Vecer, J., Sulc, M., Teisinger, J., Obsilova, V., Obsil, T.: Both the N-terminal Loop and Wing W2 of the Forkhead Domain of Transcription Factor Foxo4 Are Important for DNA Binding, *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 8265–8275 (2007)
- 13 Weigelt, J., Kliment, I., Dahlman-Wright, K., Wikström, M.: Solution Structure of the DNA Binding Domain of the Human Forkhead Transcription Factor AFX (FOXO4), *Biochemistry*, 40, 5861–5869 (2001)
- 14 Calnan, D. R., Brunet, A.: The FoxO code, *Oncogene*, 27, 2276–2288 (2008)
- 15 van der Horst, A., Burgering, B. M. T.: Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 440–450 (2007)
- 16 Lakowicz, J. R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York (1983)