

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie



Cílená mutagenese a exprese DNA–vazebné domény proteinu FOXO4

Bakalářská práce

Chemie životního prostředí

Školitel: Doc. RNDr Tomáš Obšil, PhD.

Praha 2008

Eva Macáková

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomohli vypracovat tuto bakalářskou práci.

Děkuji svému školiteli Doc. RNDr. Tomáši Obšilovi, PhD., za věnovaný čas a trpělivost, odborné vedení a cenné rady, které mi během práce poskytl.

Děkuji všem ostatním studentům a pracovníkům laboratoře za pomoc při práci a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Děkuji své rodině za podporu, kterou mi poskytuje nejen po dobu mého studia.

Prohlášení

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

V Praze dne.....

.....
Eva Macáková

Seznam použitých zkratek

ATP	adenosin trifosfát
BL21 (Rosseta)	kmen bakterií <i>E. coli</i>
CTP	cytosin trifosfát
D	kyselina asparagová
Da, kDa	dalton, kilodalton
DAF – 16	transkripční faktor <i>C. elegans</i>
DBD	DNA-vazebná doména
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	směs nukleotidů dATP, dTTP, dGTP, dCTP
Dpn I	restrikční enzym
dsDNA	dvojvláknová (double stranded) DNA
E	kyselina glutamová
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FOXO	Forkhead box O
GTP	guanosin trifosfát
IGF	insulinový růstový faktor
IPTG	isopropyl- β -D-thio-galaktopyranosid
LB	médium dle Luria - Bertaniho
MST1	savčí Ste-20 like kinasa
NES	jaderná exportní sekvence
NLS	jaderný lokalizační signál
p53	tumorový supresor
PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
PCR	polymerázová řetězová reakce
pET-15b	plasmid
PKB/AKT	protein kinasa B
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	otáčky za minutu
S	serin

S149D	označení mutace serinu na pozici 149 na kyselinu asparagovou
S149E	označení mutace serinu na pozici 149 na kyselinu glutamovou
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	SDS-polyarylamidová gelová elektroforéza
TBE	pufr na elektroforézu
TBP	TATA – vazebný protein
TEMED	N,N,N',N' - tetrametyletylendiamin
TF	transkripční faktor
Tris	Tris-(hydroxymetyl)-aminometan
UTP	uracil trifosfát

Obsah

1 Úvod.....	7
2 Literární přehled.....	8
2.1 Transkripční faktory.....	8
2.2 FOXO transkripční faktory.....	9
2.2.1 Struktura FOXO.....	10
2.2.2 Funkce FOXO proteinů.....	12
2.2.3 Fosforylace FOXO DNA vazebné domény.....	14
2.2.4 Acetylace.....	15
2.2.5 Ubiquitinace.....	15
2.2.6 Úloha fosforylace jako odpověď buněčnému stresu.....	15
3 Cíle práce.....	16
4 Materiály a metody.....	17
4.1 Použitý materiál.....	17
4.1.1 Chemikálie.....	17
4.1.2 Ostatní.....	17
4.2 Plasmid.....	18
4.3 PCR.....	18
4.4 Štěpení pomocí restrikčního enzymu Dpn I.....	20
4.5 Elektroforéza.....	20
4.6 Transformace plasmidové DNA (bakterií).....	21
4.7 Kultivace bakterií.....	21
4.7.1 Příprava LB média.....	22
4.7.2 Příprava LB agarových misek.....	22
4.8 Skladování bakterií.....	22
4.9 Izolace plasmidové DNA.....	22
4.10 Expresní systém.....	23
4.11 Expresní test.....	23
4.12 SDS – PAGE.....	23
5 VÝSLEDKY.....	25
5.1 Příprava mutantů.....	25
5.2 Expresní test.....	27
6 Diskuse.....	28
7 Závěr.....	29
Seznam citované literatury.....	30

1 ÚVOD

Transkripční faktory jsou bílkoviny, které se účastní transkripce spolu s RNA-polymerasou II. Váží se na DNA v oblasti promotoru, vytvářejí s RNA-polymerasou II transkripční iniciační komplex a ovlivňují průběh transkripce. FOXO4, který se řadí do skupiny forkhead transkripčních faktorů, patří mezi klíčové faktory v buněčné regulaci. Z výzkumu vyplývá, že ovlivňují buněčný růst, celkový metabolismus a buněčnou smrt, v komplexních organismech hrají úlohu v procesu stárnutí a nemocech ovlivňujících stárnutí jako je rakovina nebo diabetes [1].

DNA vazebná doména FOXO transkripčních faktorů je evolučně zakonzervovaná od jednoduchých živočichů po savce. Skládá se ze tří α -helixů a dvou smyček podobných motýlím křídům. V helixu H3 dochází k fosforylaci, která aktivuje transkripční aktivitu FOXO4. Serin 149 se však také přímo podílí na vazbě s DNA. Proto je logické předpokládat, že fosforylace S149 způsobí inhibici vazby FOXO4 na DNA, protože jak DNA, tak fosforylovaná aminokyselina jsou záporně nabitě. Tento zřejmý rozpor zůstává stále nejasný.

Cílem mé práce bylo zmutovat serin 149 na kyselinu asparagovou a glutamovou, které jsou záporně nabitě a tím napodobují efekt fosforylace, a posléze ze zmutované DNA připravit bílkoviny, které budou mutaci obsahovat.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Transkripční faktory

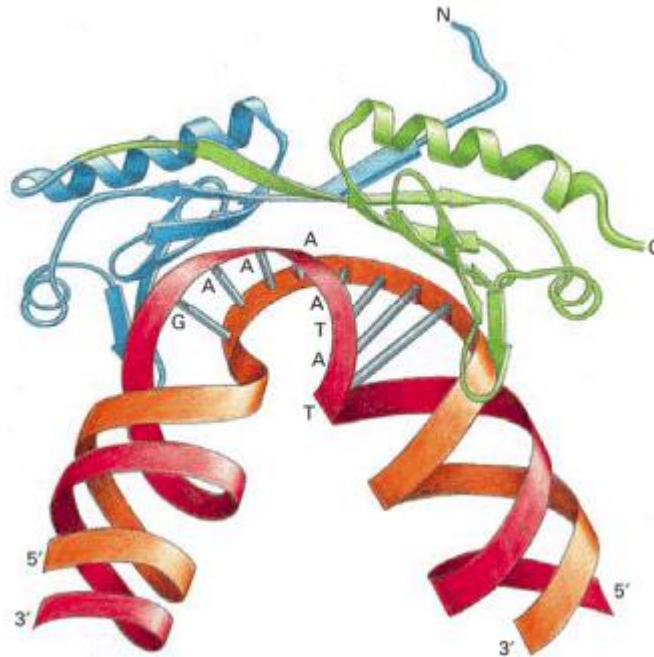
Transkripce je prvním krokem pro uplatnění genetické informace v buňce. Dochází při ní k přepsání nukleotidové sekvence DNA (genu) do nukleotidové sekvence RNA. Dochází k rozvolňování dvoušroubovice DNA, jeden z řetězců pak slouží jako templát pro syntézu RNA, která je (stejně jako při replikaci) určena komplementaritou bazí. Pokud se volný ribonukleotid se páruje s deoxyribonukleotidem v DNA, je kovalentně připojen k rostoucímu řetězci RNA enzymově katalyzovanou reakcí.

Enzymy, které přepisují DNA do RNA se nazývají RNA–polymerasy. Katalyzují vznik fosfodiesterové vazby, která spojuje jednotlivé nukleotidy. RNA se pohybuje krok za krokem po DNA, rozvíjí její dvoušroubovicový řetězec a uvolňuje tak jedno vlákno pro komplementární párování s volnými ribonukleotidy. Syntéza probíhá směrem od 5' k 3' konci a pro její syntézu jsou využívány ribonukleosid trifosfáty (ATP, UTP, GTP a CTP).

Rozlišujeme tři typy RNA–polymerasy – I, II a III, u eukaryot je nejpodstatnější RNA–polymerasa II. Tyto enzymy musí před začátkem transkripce přesně rozeznat začátek genu a navázat se na toto místo, potom se enzym pohybuje ve směru transkripce a nakonec přepis ukončí. Při vazbě RNA–polymerasy na DNA je klíčová úloha mnoha bílkovin, tzv. transkripčních faktorů, které spolu s RNA–polymerasou vytvoří transkripční iniciační komplex. Transkripční faktory jsou regulační proteiny, vážící se na oblast promotoru a ovlivňující průběh transkripce.

Transkripční faktory jsou proteiny, které pomáhají umístit RNA–polymerasu přesně na místo začátku transkripce a pomáhají oddělovat dvoušroubovici DNA aby mohla transkripce začít. Dále umožňují uvolnit RNA–polymerasu z promotoru do elongačního cyklu, když transkripce začala. Transkripční faktory RNA–polymerasy II se označují se jako TFII. Proces začíná svázáním faktorem TFIID s krátkým úsekem dvoušroubovice DNA, který je složen z nukleotidů A a T. Z toho důvodu se tato sekvence nazývá TATA nebo TATA – box a podskupina TFIID která tuto sekvenci rozpoznává se nazývá TBP (podle TATA – binding protein.) Navázání proteinu způsobí dramatický lokální ohyb DNA, který pravděpodobně

umožňuje navázání k promotoru a následné nasednutí i ostatních proteinů. Zkompletování faktorů s RNA–polymerasou II pak vytvoří kompletní transkripční iniciační komplex.



Obr. 2.1 Třírozměrná struktura TATA vazebného proteinu navázaného na DNA [2].

K připojení RNA–polymerasy k templátovému řetězci DNA je zapotřebí další transkripční faktor, TFIIF, jehož jedna podjednotka má kinasovou aktivitu. RNA-polymerasa potom zůstává na promotoru, kde syntetizuje krátké úseky RNA, dokud nezmění svou konformaci a není uvolněna na transkripci genu, k čemuž dochází fosforylací konce RNA polymerasy, katalyzovanou také TFIIF. RNA-polymerasa se poté odpoutá od transkripčních faktorů, změní svou konformaci, připojí se pevněji na řetězec DNA a začne prodlužovat řetězec RNA. Transkripční faktory se uvolní z DNA aby mohly začít další transkripci s jinou molekulou RNA-polymerasy [2].

2.2 FOXO transkripční faktory

FOXO transkripční faktory jsou klíčové proteiny v regulaci celé řady buněčných procesů. Hrají roli v v buněčné smrti, růstu, celkovém metabolismu a ovlivňují celkovou

délku života buňky. Regulace FOXO je ovlivněna především protein kinasou B (PKB/AKT), která zprostředkovává fosforylaci a insulinovou signalizaci. Z výzkumu vyplývá, že FOXO proteiny mají důležitou úlohu v procesu stárnutí a nemocech ovlivněných stárnutím jako je rakovina nebo diabetes [1].

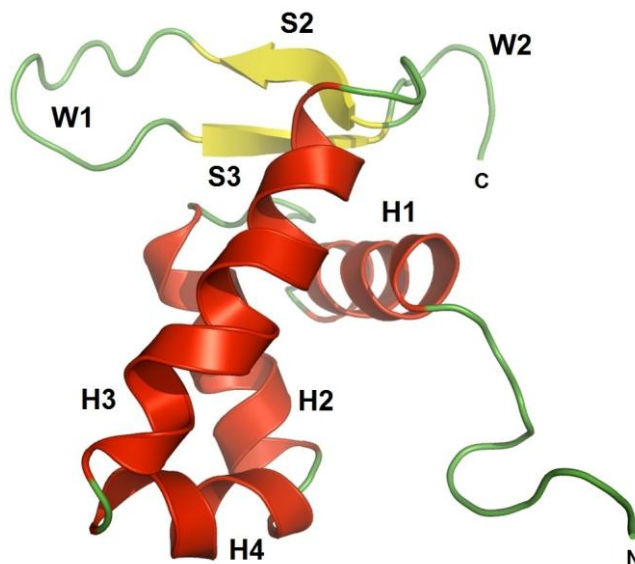
FOXO proteiny jsou členy rodiny transkripčních faktorů. První identifikovaný člen skupiny transkripčních faktorů byl gen *Drosophila melanogaster fork head*, u nějž bylo zjištěno, že je nezbytný pro vytvoření konečné stavby embrya [3]. Jsou evolučně zakonzervované s charakteristickým DNA–vazebným motivem, který byl nazván forkhead doména. Tato doména se skládá ze tří α -helixů a dvou smyček podobných motýlím křídům. V posledních letech bylo objeveno více než sto členů, které ovlivňují rozvoj, diferenciaci, růst, bujení, apoptózu, odolnost vůči stresu a metabolismus. Během evoluce počet forkhead genů stoupal, nejvíc jich mají obratlovci (jen u lidí je jich nejméně 43) [4].

Skupina FOXO má čtyři zástupce – FOXO1, FOXO3, FOXO4 a FOXO6, které se mimo jiné liší způsobem a místem exprese. Díky velmi podobné DNA–vazebné doméně se předpokládá, že se všechny FOXO proteiny váží na stejnou sekvenci DNA v jádře. Sekvence, která je specificky rozpoznávána FOXO faktory byla určena jako 5'-TTGTTTAC-3' [5]. Všechny FOXO proteiny tedy dokážou regulovat stejnou skupinu genů vazbou na tuto sekvenci. Když se porovnájí transkripční aktivity expresí jednotlivých FOXO, je patrné široké překrytí genových expresí. Specifita funkcí je tedy dána interakcemi a dalšími regulátory [6].

2.2.1 Struktura FOXO

Studium struktury těchto proteinů začalo určením krystalické struktury DNA–vazebné domény proteinu FoxA3 – DNA komplexu [7]. FoxA3 je transkripční faktor specifický pro játra, který hraje důležitou roli v diferenciaci buněk a specifické genové expresi [8]. Jeho struktura ukazuje, že forkhead/winged helix motiv je kompaktní struktura obsahující okolo 110 aminokyselinových zbytků, které jsou složeny do tří α -helixů (H1, H2 a H3), tří β vláken (S1, S2 a S3) a dvou smyček (W1 a W2). Uspořádání domény je H1 – S1 – H2 – H3 – S2 – W1 – S3 – W2. Vlákno S1, vložené mezi helixy H1 a H2, interaguje s řetězcí S2 a S3, což vede ke vzniku třívláknovému, zatočenému, antiparalelnímu β -listu. N-konec domény je

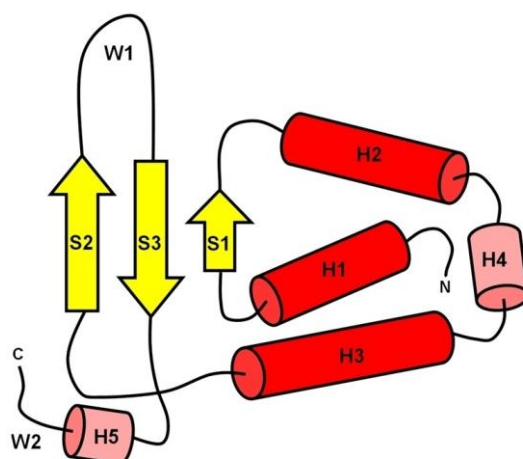
formován shlukem tří α -helixů, C-konec je složen z β vláken S2 a S3 a dvou velkých smyček (křídlo W1 a W2), které vyčnívají z β -listu.



Obr. 2.2 Třírozměrná struktura DNA-vazebné domény FOXO4, sekvence S92 – G181 [9].

Třírozměrné struktury forkhead domén byly získány pomocí proteinové krystalografie nebo nukleární magnetické rezonanční spektroskopii. Tyto struktury ukazují, že mezi různými forkhead doménami jsou nepatrné rozdíly v sekundární struktuře. Forkhead doména FOXO4 a dalších obsahuje navíc krátký helix typu 3_{10} , který je umístěn mezi α -helixy H2 a H3 [9].

Forkhead doména FOXO proteinů se váže jako monomer k sekvenci 5'GTAAACAA-3', známé jako vazebný element DAF-16 rodiny [5, 10]. Tato sekvence zahrnuje minimální sekvenci 5'-(A/C)AA(C/T)-3' [11, 12, 9], rozpoznávanou všemi forkhead proteiny. FOXO proteiny také rozpoznávají sekvenci 5'-(C/A)(A/C)AAA(C/T)AA-3', která se liší od vazebného elementu DAF-16 rodiny prvními dvěma bázemi [13, 14]. FOXO se dokážou vázat na obě sekvence, ale větší afinitu mají k DAF-16 sekvenci [5]. DNA-vazebná doména FOXO proteinů má velmi podobnou strukturu jako u ostatních forkhead faktorů. Jedním z rozdílů je o 5 aminokyselin delší segment mezi helixy H2 a H3, což má ale na konečnou strukturu pouze nepatrný efekt.



Obr. 2.3 Topologie forkhead domény FOXO faktorů [1].

Helix H3 z forkhead DNA–vazebné domény slouží jako hlavní DNA rozpoznávací místo s příslušnou sekvencí uvnitř velkého žlábků DNA. Mnoho dalších oblastí domény včetně N–koncového segmentu předcházející helix H1, oblast mezi helixy H2 a H3, křídlo W1 a C–koncový segment také interaguje s DNA a ovlivňují konečnou afinitu forkhead domén k DNA a stabilitu komplexů [15].

U FOXO proteinů dochází k mnoha posttranslačním modifikacím jako jsou fosforylace, acetylace a ubiquitinace. Přesný mechanismus těchto modifikací stále není úplně jasný, ty však významně ovlivňují schopnost vázat DNA. FOXO faktory jsou fosforylovány celou řadou kinas. Mezi nejdůležitější z hlediska regulace patří AKT/PKB kinasa, která fosforyluje FOXO proteiny na třech místech [1].

2.2.2 Funkce FOXO proteinů

FOXO transkripční faktory hrají důležitou úlohu v kontrole buněčného cyklu, diferenciaci, kontrole metabolismu, odpověď na stres a apoptóze. Jejich funkce je pevně kontrolována velkým množstvím interakcí protein–protein a posttranslačními modifikacemi jako je fosforylace, acetylace a ubiquitinace. Funkce FOXO proteinů má také vliv na délku života. Dále jsou FOXO proteiny regulovány negativní zpětnou vazbou protein kinasou B (PKB/AKT), která zprostředkovává fosforylaci a jsou důležitou součástí signální cesty insulínu [18].

FOXO jsou analogické s transkripčním faktorem DAF-16 z hlístice *Caenorhabditis elegans*, který reguluje délku života u *C. elegans* [16]. V buňkách savců se ukazuje, že transkripční aktivita FOXO je regulována také insulinovým (nebo insulinu podobným) růstovým faktorem IGF, signalizujícím přes přímou fosforylaci, zprostředkovanou AKT/PKB. AKT/PKB zprostředkovaná fosforylace FOXO inhibuje jejich funkci tím, že podporuje jejich interakce s 14-3-3 proteiny a jejich přemístěním z jádra do cytoplazmy. Další studie na *C. elegans* a *D. melanogaster* ukázaly, že základní molekulární cesta signalizace insulinu DAF-16/FOXO je identická u hlístů, much i savců. Je tedy zakonzervovaná napříč evolucí, což vede mimo jiné k závěru, že FOXO, jako DAF-16, ovlivňují délku života u vyšších eukaryot [17].

Aktivita FOXO proteinů je pevně vázaná a kontrolovaná posttranslačními modifikacemi, fosforylací, acetylací a ubiquitilací. Vzrůstající buněčný oxidativní stres ovlivňuje mnoho těchto posttranslačních modifikací FOXO a naopak, FOXO proteiny jsou nejspíš schopny regulovat resistenci vůči buněčnému stresu z čehož vyplývá, že jsou navzájem složitým způsobem spojeny. Toto spojení ukazuje na vliv FOXO proteinů na délku života a onemocnění, vzhledem k tomu, že stárnutí je výsledkem poškození organismů v důsledku oxidací. Je zřejmé, oxidativní stres a jeho ovlivňování FOXO je regulováno enzymy, které regulují také tumorový supresor p53. Toto funkční spojení mezi FOXO a p53 a jejich společná regulace může být základem pro ovlivňování nemocí a celkové délky života [18].

Různé funkce insulinu v buňce jsou zprostředkovány insulin-zprostředkovanou inhibicí FOXO, což ukazuje, že FOXO tvoří důležitý cíl insulin-fosfatidylinositol 3-kinasy – AKT/PKB signální cesty. Funkce insulinu je v první řadě regulace rovnováhy glukosy stimulací adsorpce glukosy a jejího dalšího metabolismu (glykolýzy a syntézy glykogenu). FOXO proteiny regulují genovou expresi enzymů jako je fosfoenolpyruvátcarboxykinasa a glukosa-6-fosfatasa, které jsou zásadními regulátory glukoneogeneze. Dále mohou FOXO potlačovat expresi genů které jsou důležité v glykolýze, pentosovém cyklu a syntéze lipidů. Kromě toho indukují vznik metabolického stavu, který je podobný situaci při nízké hladině glukosy a nedostatku potravy. Dostatečná výroba ATP v buňce za těchto podmínek potom závisí na štěpení mastných kyselin a oxidativní fosforylaci [18].

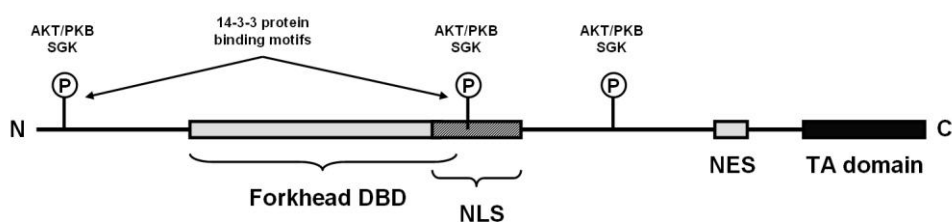
Následně v peroxisomech a mitochondriích dochází ke stresu, na jehož odstranění FOXO reguluje několik antioxidantních enzymů jako je katalasa či superoxidodismutasa. FOXO také regulují acetyl-CoA přenášející „sterol carrier protein x“ [19], který

pravděpodobně chrání nenasycené mastné kyseliny před poškozením oxidací a kontroluje, zda jsou vytvořeny správně. Kromě metabolických funkcí insulinu ovlivňují FOXO také jiné funkce, jako je např. stimulace buněčného cyklu, dále při nedostatku insulinu pozastavení cyklu a jeho přechod do buněčného klidu. FOXO zvyšují sensitivitu insulinu zprostředkováním exprese insulinového receptoru. Tato zpětná kontrola je důležitá při potřebě reagovat rychle na zvýšení hladiny glukosy, případně na nedostatek potravy.

AKT/PKB chrání buňky před apoptózou a, jak bylo pozorováno, vynucená FOXO aktivita indukuje apoptózu přes FOXO–zprostředkovanou regulaci různých pro–apoptických genů, například Fas ligand, BIM a BCL–6 [20, 21, 22], což může znamenat možný vliv FOXO na délku života. Jakkoli, FOXO adaptuje buňky a organismy na nedostatek potravy. Z toho vyplývá, že apoptóza způsobená FOXO pravděpodobně nastává jenom při nevhodně prodloužené aktivaci nebo ve speciálních typech buněk, jako jsou haemotopoietické buňky a nervové buňky [18].

2.2.3 Fosforylace FOXO DNA vazebné domény

K fosforylaci dochází jako odpověď růstovým signálům, fosfatidylinositol 3–kinasa aktivuje AKT/PKB a závislé serum– a glukokortikoid– inducible kinasa potom fosforyluje FOXO proteiny na třech místech [23–28]. První je umístěn na N–konci, druhý na forkhead doméně a třetí mezi NLS a NES. Druhé AKT/PKB místo fosforylace je umístěno v křídle W2 FOXO DBD. Základ AKT/PKB fosforylace nese podobný motiv jako 14–3–3 vazebné motivy. AKT/PKB fosforylace na N-konci a ve forkhead doméně vytvoří dva 14–3–3 vazebné motivy a indukuje vazbu FOXO na jaderné 14–3–3 proteiny což může znamenat, že se proteiny 14–3–3 mohou účastnit přerušování vazby FOXO na DNA [23, 24, 27, 29].



Obr. 2.4 Schéma primární struktury FOXO transkripčních faktorů [1].

2.2.4 Acetylace

Aktivace fosfatidylinositol 3–kinasy – AKT/PKB způsobí fosforylaci FOXO, jejich vazbu na 14–3–3 proteiny a uložení do cytoplazmy. Na druhou stranu, aktivace a umístění FOXO v jádře může být způsobena úbytkem insulinu nebo stresem [18, 30 - 32]. Přemístění FOXO je provázáno jeho acetylací pomocí histonacetyltransferas. Acetylace FOXO nejspíš paradoxně způsobuje potlačení transkripční aktivity, je reverzibilní pomocí FOXO deacetylas. K acetylaci dochází na C–koncích, což ovlivňuje lysinové zbytky na křídle W2 a způsobuje inhibici vazby FOXO na DNA [32].

2.2.5 Ubiquitinace

K polyubiquitilaci FOXO dochází pomocí E3 ubiquitinlipasy, AKT/PBK a správnému umístění v buňce. Při ubiquitinaci dochází k proteosomální degradaci FOXO. Je způsobena vzrůstajícím buněčným stresem, relokizací a zvýšením transkripční aktivity. Odehrává se na C–koncích forkhead domény [33, 34].

2.2.6 Úloha fosforylace jako odpověď buněčnému stresu

Fosforylace FOXO je způsobena signalizací insulinu a vzrůstajícím buněčným stresem. Kromě AKT/PKB je fosforylace regulována také savčí 20–like kinasou 1 (MST1) [35], která aktivuje fosforylaci *in vivo*, ale jak se přesně odehrává je dosud nejasné. MST1 fosforyluje FOXO3 na serinu 207 a FOXO4 na serinu 149 umístěném na třetím helixu DNA–vazebné domény. Na tomto úseku dochází k vazbě na DNA. U fosforylace na tomto místě by se předpokládalo, že vazbu na DNA oslabí, protože způsobí záporné nabití řetězce a tím repulze s DNA [1].

3 CÍLE PRÁCE

- Pomocí bodové mutagenese připravit cDNA pro expresi mutantů S149D a S149E forkhead domény lidského transkripčního faktoru FOXO4.
- Provést expresní test a ukázat jestli se mutanty exprimují v bakteriích *E. coli*.

4 MATERIÁLY A METODY

4.1 Použitý materiál

4.1.1 Chemikálie

- agar – Carl Roth GmbH, Německo
- agarosa – Carl Roth GmbH, Německo
- ampicilin – Sigma, USA
- bacto trast extrakt (kvasničný extrakt) – Carl Roth GmbH, Německo
- bis – akrylamid – Carl Roth GmbH, Německo
- bromfenolová modř – Sigma, USA
- Coomassie Brilliant Blue R – 250 – Lachema a.s., ČR
- ethidiumbromid - Carl Roth GmbH, Německo
- glycerol – Lachema a.s., ČR
- chlorid draselný – Lachema a.s., ČR
- chlorid sodný - Carl Roth GmbH, Německo
- IPTG – Sigma, USA
- isopropylalkohol – Sigma, USA
- kyselina chlorovodíková – Lachema a.s., ČR
- kyselina octová – Lachema a.s., ČR
- methanol – Lachema a.s., ČR
- persulfát amonný – Sigma, USA
- SDS – Sigma, USA
- TEMED (N,N,N',N'-tetraethylendiamin – Carl Roth GmbH, Německo
- Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan - Carl Roth GmbH, Německo
- trypton - Carl Roth GmbH, Německo

4.1.2 Ostatní

- DNA primery – VBC-Genomics, Rakousko
- Dpn I – New England Biolabs, USA
- E. coli BL21 (Rosseta) – Stratagene, USA
- E. coli DH α – Stratagene, USA
- laboratorní sklo – Simax, ČR
- vektor-pET-15b – Invitrogen, USA
- petriho misky – Gama Group a.s., Trhové sviny
- pipeta 25 μ l pro nanášení vzorků na elektroforézu – Hamilton Co, USA
- pipety – Eppendorf, Německo
- Quick ChangeTM Site-Directed Mutagenesis kit – Stratagene, USA
- špičky na pipety – INSET, Praha

4.2 Plasmid

Na mutagenesi byl použit plasmid pET-15b v němž je zaklonována sekvence DNA-vazebné domény FOXO4. Tento plasmid jsem dostala od Doc. RNDr. T.Obšila, PhD.

4.3 PCR

PCR (Polymerase Chain Reaction) je enzymaticky řízená reakce, při které dochází k amplifikaci určitého úseku DNA, jde tedy o replikaci DNA *in vitro*. Metoda PCR se využívá v laboratořích určování dědičných nemocí, určování otcovství, diagnostice infekčních onemocnění, klonování, metagenesím atd.

Na praktické provedení PCR je potřeba: templátová DNA obsahující segment, který chceme amplifikovat (zmnožit); oligonukleotidy určující počátek a konec úseku, který bude amplifikován; DNA polymerasu syntetizující komplementární vlákno podle templátové DNA; dNTP, ze kterých syntetizuje DNA polymerasa nově vznikající vlákno; reakční pufr zajišťující optimální reakční prostředí a vodu.

DNA polymerasa syntetizuje nové vlákno ve směru $5' \rightarrow 3'$. Není schopna vytvářet vlákno „de novo“, ale pouze připojovat dNTP k volnému $3'$ konci vznikajícího vlákna. Součástí reakční směsi proto musí být uměle nasyntetizované oligonukleotidy (tzv. primery), které nasedají na komplementární úsek templátové DNA a na jejich volné $3'$ konce pak DNA polymerasa připojuje dNTP.

PCR reakce probíhá v termocykleru ve třech opakujících se krocích. V prvním kroku je teplota zvýšena na $94 - 96^{\circ}\text{C}$ a dochází k denaturaci DNA, tzn. k separaci řetězců dsDNA. Ve druhém kroku dojde ke snížení teploty na $46 - 65^{\circ}\text{C}$. Při této teplotě dochází k annealingu (nasednutí) oligonukleotidů na komplementární úsek templátové ssDNA. Ve třetím kroku je teplota opět zvýšena na $70 - 74^{\circ}\text{C}$ a začne probíhat elongace (prodlužování řetězce). Tyto tři kroky se opakují $20 - 30 \times$, což je potřeba k syntéze požadovaného množství DNA. Množství amplifikovaného úseku roste geometrickou řadou, konečný produkt tím pádem obsahuje velké množství požadovaného segmentu DNA a pouze velmi malé množství templátové DNA.

PCR reakce byla využita pro mutaci serinu S149 na kyselinu glutamovou (E) a asparagovou (D). Nejdříve bylo potřeba navrhnout vhodné oligonukleotidy. Zvolené oligonukleotidy obsahovaly 40 nukleotidů, nebyly však komplementární k templátové DNA v celém úseku, ale sekvence byla záměrně pozměněna tak, aby triplet kódující serin byl nahrazen tripletem kódujícím kyselinu glutamovou nebo asparagovou.

Použité oligonukleotidy:

DBD–S149D-1

5' – ctc agc agg atg gaa gaa cga tat ccg cca caa cct gtc c – 3'

DBD–149D-2

5' – gga cag gtt gtg gcg gat atc gtt ctt cca tcc tgc tga g – 3'

DBD–S149E-3

5' – ctc agc agg atg gaa gaa cga gat ccg cca caa cct gtc c – 3'

DBD–S149E-4

5' – gga cag gtt gtg gcg gat ctc gtt ctt cca tcc tgc tga g – 3'

Složení PCR reakční směsi:

- 4 µl oligonukleotid S149D-1 (resp. S149D-2)
- 4 µl oligonukleotid S149E-3 (resp. S149E-4)
- 3 µl dNTP (5 mM)
- 5 µl reakční pufr
- 1 µl Pfu DNA polymerasa
- 31 µl ultračistá voda

Složení reakčního pufru: 0,1 M KCl; 0,1 M (NH₄)₂SO₄; 0,2 M Tris/HCl (pH 8,8); 0,02 M MgSO₄; 1% Triton–X–100; 1 g/dm³ BSA

PCR reakce proběhla v termocykleru Eppendorf Mastercycler, Německo.

Program PCR reakce byl nastaven:

1. fáze – 95°C, 30 s
2. fáze – 51°C, 60 s
3. fáze – 68°C, 12 min

Tyto tři fáze se opakovaly 20x, následně se teplota snížila na 4°C až do doby, než byl produkt z termocykleru vyjmut.

4.4 Štěpení pomocí restrikčního enzymu Dpn I

Po skončení PCR reakce obsahoval produkt velké množství zmutované DNA a kromě toho malé množství původní templátové DNA, kterou bylo potřeba odstranit. Na odstranění byl použit restrikční enzym Dpn I, který specificky štěpí methylovanou DNA. Templátová DNA, která vznikla v bakteriích, je na rozdíl od mutované DNA, vzniklé reakcí PCR, methylována. Ke každému PCR produktu byl přidán 1,5 µl Dpn I a směs byla inkubována asi 1 h při 37°C.

4.5 Elektroforéza

Na zjištění, zda DNA zmutovala, se použila metoda horizontální gelové elektroforézy v agarosovém gelu. Sacharido-fosfátová páteř nukleových kyselin je příčinou rovnoměrného rozložení negativních nábojů v molekulách DNA a RNA. Pohyb těchto vysoce elektronegativních molekul v elektrickém poli vede k jejich separaci podle molekulové hmotnosti. Záporně nabitá DNA putuje gelem k anodě.

Bylo použito 40 ml 1% gelu, vyrobeného z 0,4 ml agarosy a 40 ml pufru TBE. Po rozpuštění zahřátím bylo přidáno 4 µl ethidiumbromidu (silně mutagenní, fluorescenční látka, která se váže mezi báze DNA). Jako standard molekulových hmotností bylo použito 10 µl směsi molekul DNA o různé délce, k produktu PCR bylo přidáno 3 µl vzorkového pufru. Do elektroforetického gelu, ponořeného do pufru TBE, bylo nanášeno 1x 10 µl roztoku standardu

a 4x PCR produkt (po 10 μ l). Elektroforéza probíhala přibližně 1 h při napětí 70–75 V. Poté byl gel vizualizován na transiluminátoru v UV světle.

4.6 Transformace plasmidové DNA (bakterií)

Transformace je proces, u kterého dochází k horizontálnímu přenosu genetické informace z donorového kmene bakterií do jiných buněk, které musí být kompetentní, tj. schopné přijmout cizí DNA. Aby byla transformace úspěšná, musí být plasmid vpraven do bakterií, tj. musí dojít k překonání bariéry buněčné stěny a cytoplazmatické membrány. V laboratorní praxi se k tomu využívá metody teplotního šoku (heat shock), při kterém jsou bakterie ponořeny na 45 s do lázně o teplotě 42°C a následně vloženy na 2 minuty do ledu, čímž dojde k rozrušení buněčné stěny.

Ke 40 μ l kompetentních buněk *E. coli* bylo přidáno 1 μ l plasmidové DNA po PCR a štěpení Dpn I. Směs se nechala inkubovat 20 minut na ledu. Poté byla směs ponořena přesně na 45 sekund do lázně o teplotě 42°C a následně opět na 2 minuty do ledu. Následně bylo přidáno 400 μ l LB média, podporujícího růst bakterií, a směs byla inkubována při 37 °C 1 hodinu. Poté byla směs přenesena na čtyři Petriho misky s LB agarem, který obsahoval antibiotikum ampicilin (100 μ g/ml). Petriho misky se vložily do inkubátoru, kde se při teplotě 37 °C inkubovaly přes noc. Plasmid, použitý jako vektor, nese gen s resistencí vůči ampicilinu, tím pádem pouze bakterie, které plasmid přijaly, mohly vyrůst na těchto Petriho miskách.

4.7 Kultivace bakterií

Bakterie byly kultivovány na pevném LB agaru nebo v tekutém LB médiu. Kultivace probíhala přes noc při 37 °C v termostatu nebo na třepačce (190 rpm). Do LB agaru či tekutého LB média bylo přidáno antibiotikum ampicilin, vůči kterému nese plasmid pET-15b resistenci, tak, aby koncentrace byla 100 μ g/ml.

4.7.1 Příprava LB média

Směs 10 g tryptonu, 5 g kvasničného extraktu a 10 g NaCl byla doplněna do 1 litru destilovanou vodou a po úpravě pH na 7,4 byl roztok sterilizován v autoklávu.

4.7.2 Příprava LB agarových misek

10 g tryptonu, 5 g kvasničného extraktu, 10 g NaCl 20 g agaru bylo smícháno a doplněno do 1 l destilovanou vodou. Po sterilizaci v autoklávu a ochlazení bylo přidáno 1 ml ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml. Po 15 ml LB agaru bylo posléze nalito na Petriho misky.

4.8 Skladování bakterií

Pro krátkodobé skladování byly bakterie na Petriho miskách skladovány ve 4°C, zabezpečené proti vyschnutí. Pro dlouhodobé skladování byly bakterie v živném bujónu smíchány se sterilním glycerolem do koncentrace 30% a skladovány byly v -80°C.

4.9 Izolace plasmidové DNA

Plasmidová DNA byla izolována z 5 ml pře noc narostlé bakteriální kultury pomocí komerční sady „JETquick plasmid miniprep spin kit“ pro purifikaci plasmidové DNA od firmy Genomed GmbH (Německo). Izolace byla prováděna podle instrukcí výrobce.

4.10 Expresní systém

K expresi proteinu byl použit bakteriální expresní systém *E. coli* BL21(DE3). BL21(DE3) je speciální kmen bakterií vhodný pro dlouhodobé uchovávání a následnou expresi proteinů. Indukce se provádí pomocí IPTG, což je induktor exprese rekombinantních proteinů a po jeho přidání k bakteriální kultuře transformované pET-15b dojde ke spuštění proteosyntézy.

Kolonie bakterií byla pomocí sterilního očka přenesena do 5 ml LB média a přes noc inkubovány při 37°C a konstantním třepání (190 rpm). Následně bylo přeneseno 200 µl bakteriální kultury do 5 ml LB média, ve kterém se bakterie pěstovaly, dokud nedosáhly optické density 0,7 – 0,8 (měřeno při 600nm).

4.11 Expresní test

Narostlé kultury bakterií v LB mediu (jak s mutací S149D, tak i S149E) byly naředěny LB médiem. Do každé zkumavky bylo přidáno 5 µl čerstvého antibiotika (koncentrace zásobního roztoku byla 100 mg/ml). Zkumavky s kulturami byly umístěny na 20 minut do třepačky a poté bylo přidáno 15 µl roztoku induktoru IPTG a zkumavky byly opět umístěny do třepačky a inkubovány přes noc. Druhý den ráno byly odebrány vzorky pro SDS-PAGE (20 µl kultury).

4.12 SDS – PAGE

SDS – PAGE je polyakrylamidová elektroforéza v prostředí dodecylsírany sodného (SDS). Je to elektromigrační metoda, která využívá pohyb nabitých částic v elektrickém poli. Aniontový detergent SDS se váže na proteiny v konstantním poměru, čímž je denaturuje a udává jim jednotný záporný náboj. Proteiny pak putují gelem od katody k anodě rychlostí závislou na jejich velikosti, menší molekuly rychleji a větší pomaleji.

Pro elektroforézu byl použit 15% separační a 5% zaváděcí gel, probíhala při konstantním napětí 200 V.

Po ukončení elektroforézy byl gel vizualizován pomocí obarvení roztokem Coomassie Brilliant Blue R 250.

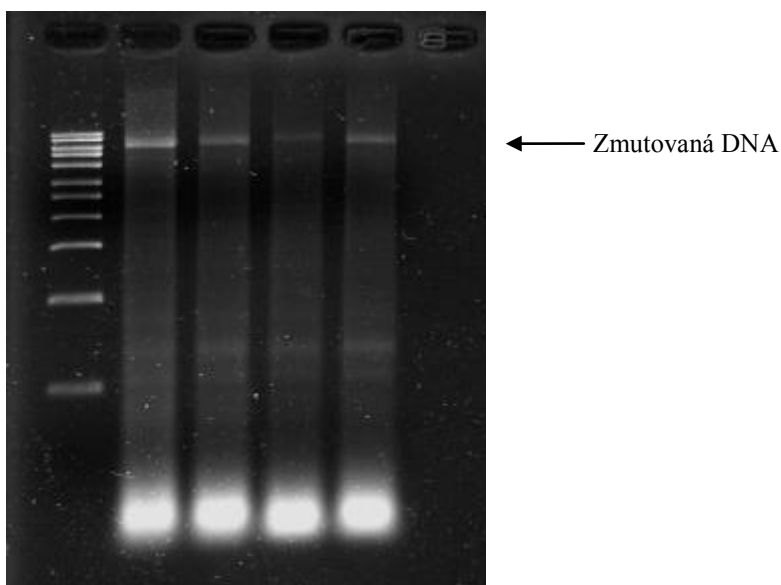
Složení gelů, pufrů a roztoků:

- Separací gel (15%): 3,75 ml akrylamid/bis – akrylamidu, 2 ml pufru pro separační gel + SDS, 1,75 ml vody, 75 μ l 10% persulfátu amonného, 8 μ l TEMEDU
- Zaváděcí gel (5%): 0,5 ml akrylamid/bis – akrylamidu, 1 ml pufru pro zaváděcí gel + SDS, 2,25 ml vody, 75 μ l 10% persulfátu amonného, 8 μ l TEMEDU
- Akrylamid/ bis – akrylamid: 29,2 g akrylamidu, 0,8 g bis – akrylamidu, voda do 100 ml
- Pufr pro separační gel: 75 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8); 4 ml 10% SDS; 21 ml voda
- Pufr pro zaváděcí gel: 50 ml 1 M Tris/HCl (pH 6,8); 4 ml 10% SDS; 46 ml voda
- Pufr pro elektroforézu: 50 mM Tris/HCl (pH 8,3); 385 mM glycin, 0,1% SDS
- Barvicí roztok: 1g Coomassie Brilliant Blue R 250; 450 ml methanol; 100 ml ledová kyselina octová; 450 ml voda
- Odbarvovací roztok: 100 ml methanol; 100 ml ledová kyselina octová; 800 ml voda
- Standard molekulových vah: Precision Plus Protein Dual Color Standard, BioRad, obsahuje směs fragmentů 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 a 10 kDa.

5 VÝSLEDKY

5.1 Příprava mutantů

Cílem mé práce byla mutace serinu S149 na kyselinu glutamovou (E) a asparagovou (D). K cílené metagenesi byla využita PCR reakce, jako templát sloužila plasmidová DNA (vektor pET – 15b se zaklonovanou sekvencí FOXO4 DNA-vazebné domény 82 – 207). Pro PCR reakci (viz kap. 4.3) byly navrženy oligonukleotidy, které obsahovaly 40 nukleotidů. Oligonukleotidy nebyly komplementární k templátové DNA v celém úseku, ale měly záměrně pozměněnou sekvenci tak, aby triplet kódující serin byl nahrazen tripletem kódujícím kyselinu glutamovou a asparagovou. Po ukončení PCR reakce byla ve směsi přítomná i původní methylovaná DNA, která byla odstraněna štěpením pomocí restrikčního enzymu Dpn I (viz kap. 4.4). Přítomnost mutované plasmidové DNA byla ověřena pomocí agarosové elektroforézy (obr. 5.1.).

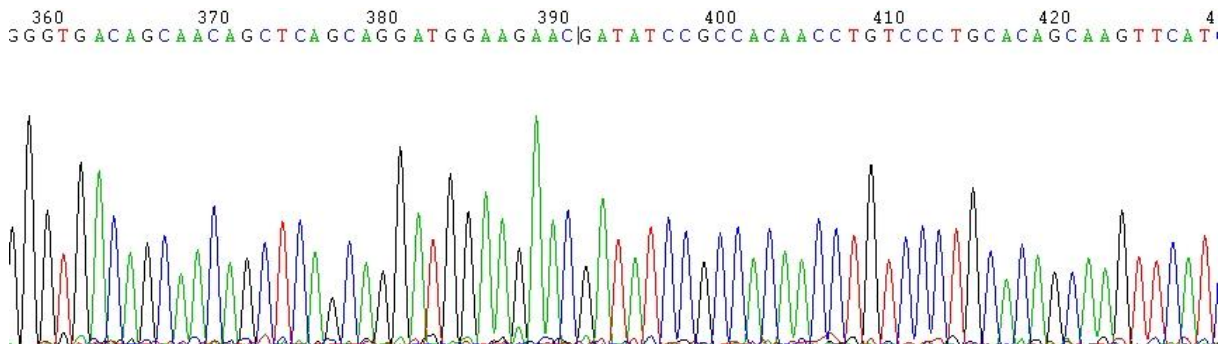


Obr. 5.1 Ověření mutace horizontální elektroforézou (viz kapitola 4. 5). Šipka označuje proužek, který odpovídá mutované plasmidové DNA.

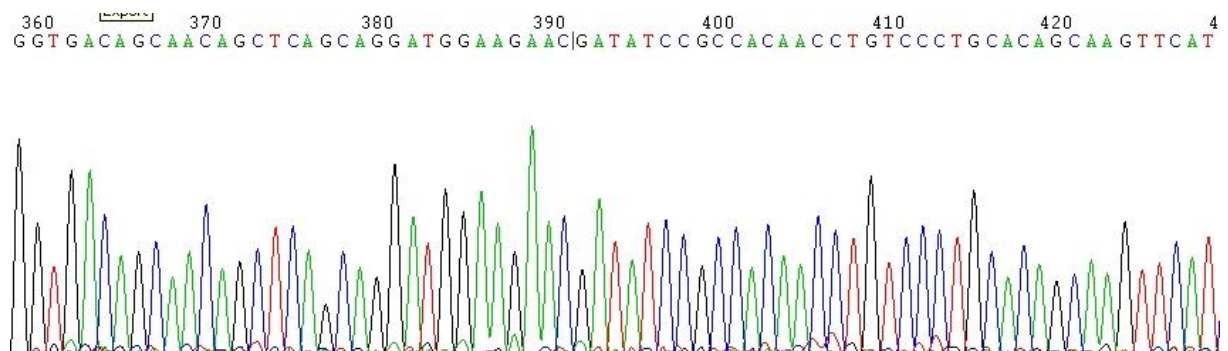
Agarosová elektroforéza ukázala, že obě PCR reakce poskytly dostatečné množství plasmidové DNA. Následně byla tato mutovaná plasmidová DNA transformována do bakterií *E. coli* (kmen DH5 α). Poté byly z každé Petriho misky přeneseny dvě kolonie do 5 ml

kapalného LB média a z narostlých kultur byly vyizolovány plasmidové DNA. Ty byly následně zaslány na sekvenaci do laboratoře Dr. Felsberga v MBÚ AVČR, v.v.i.

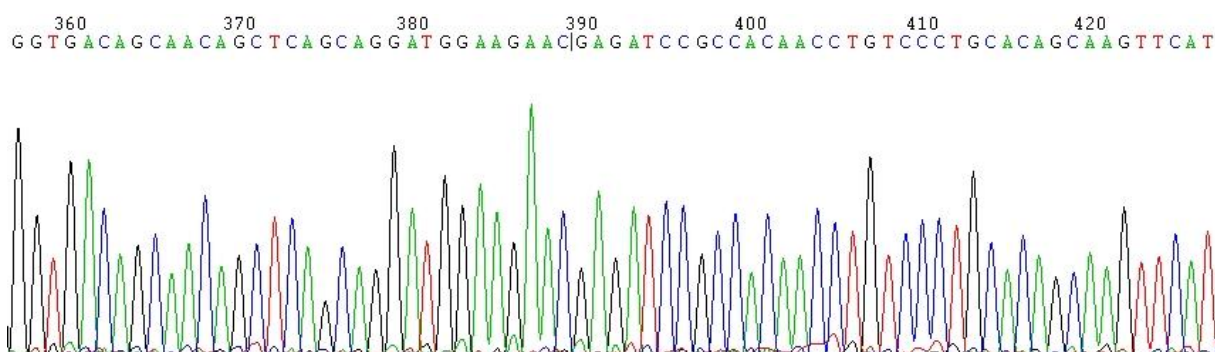
Výsledky sekvenací ukázaly, že oba vzorky s mutací S149D a jeden vzorek s mutací S149E jsou v pořádku a obsahují požadovanou mutaci (obr. 5.2 – 5.4). Zbytek sekvence zůstal zachován a neobsahoval žádné další nežádoucí mutace.



Obr. 5.2 Záznam sekvenace FOXO4 S149D vzorek č.1. Obrázek ukazuje pouze oblast obsahující mutaci S149D (triplet GAT uprostřed obrázku).



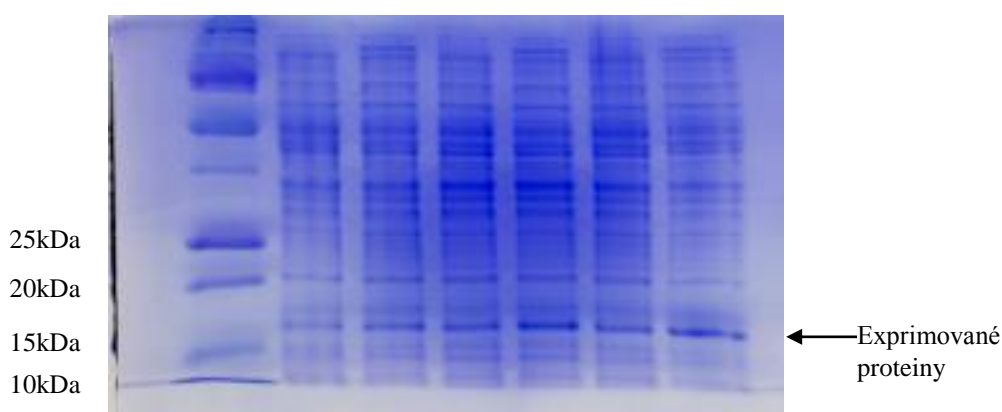
Obr. 5.3 Záznam sekvenace FOXO4 S149D vzorek č.2. Obrázek ukazuje pouze oblast obsahující mutaci S149D (triplet GAT uprostřed obrázku).



Obr. 5.4 Záznam sekvenace FOXO4 S149E vzorek č.3. Obrázek ukazuje pouze oblast obsahující mutaci S149D (triplet GAG uprostřed obrázku).

5.2 Expresní test

Expresní test (viz kapitola 4.12) byl proveden pro mutanty S149D (vzorky č. 1 a 2) a S149E (vzorek č. 3). Vzorky byly na gel nanášeny v pořadí: standard molekulových vah, S149D-1 neindukovaný, S149D-1 indukovaný, S149D-2 neindukovaný, S149D-2 indukovaný, S149E-3 neindukovaný, S149E-3 indukovaný. Analýzou gelu bylo zjištěno, že všechny tři proteiny se úspěšně exprimovaly.



Obr. 5.5 Fotografie SDS-PAGE gelu se vzorky z expresního testu. Vzorky byly nanášeny v pořadí: standard molekulových vah, S149D-1 neindukovaný, S149D-1 indukovaný, S149D-2 neindukovaný, S149D-2 indukovaný, S149E-3 neindukovaný, S149E-3 indukovaný. Z testu je vidět, že protein se po přidání induktoru exprimoval. Šipka označuje pozici proužku, který odpovídá DNA-vazebné doméně FOXO4.

6 DISKUSE

FOXO transkripční faktory hrají důležitou úlohu v kontrole buněčného cyklu, metabolismu, odpovědi na stres i apoptóze. V širším měřítku aktivita FOXO pravděpodobně souvisí i s délkou života, stárnutím a nebezpečnými nemocemi jako je diabetes nebo rakovina. [18] K regulaci funkce FOXO dochází pomocí enzymů, zejména protein kinasy B (PKB/AKT) a dále posttranslačními modifikacemi, fosforylací, acetylací a ubiquitinací. Mechanismus těchto regulací je však zatím většinou neznámý.

DNA vazebná doména FOXO transkripčních faktorů, která se přímo účastní vazby s DNA, je v průběhu evoluce zakonzervována napříč druhy, od hlístic po savce. Tato doména podléhá u různých typů forkhead faktorů různým modifikacím, které mají rozličné následky pro její interakci s DNA.

U FOXO transkripčních faktorů se setkáváme s fosforylací S149, který se nachází v helixu H3, který je hlavním místem domény pro interakci s DNA. Fosforylace S149 má za následek aktivaci transkripční funkce FOXO4 [35]. To znamená, že by neměla vadit interakci mezi FOXO4 a DNA. Strukturní studie ale ukázaly, že tento zbytek se účastní vazby DNA a vzhledem k jeho poloze by jeho fosforylace měla inhibovat interakci mezi FOXO a DNA [1]. Naše skupina se proto rozhodla tento rozpor podrobněji prostudovat.

Cílem mé bakalářské práce byla příprava mutantů FOXO4 DBD obsahující mutace S149D a S149E. Tyto mutace napodobují efekt fosforylace, protože na místo serinu vnesou aminokyseliny se záporně nabitým postranním řetězcem. Zmutované proteiny budou sloužit k dalšímu výzkumu vazby FOXO4 na DNA. Pomocí cílené mutagenese byly úspěšně připraveny oba mutanty S149D a S149E. Expres mutovaných proteinů byla otestována pomocí expresního testu (viz obr. 5.5). Při indukci pomocí IPTG trvající 12 hodin proběhla exprese úspěšně a výsledek byl ověřen pomocí SDS-PAGE. Takto připravené mutanty tedy mohou být použity pro další studium.

FOXO transkripční faktory jsou podstatnou součástí transkripce, jejich aktivita a regulace ovlivňuje délku života a zdraví buněk i organismů. Regulují i odpověď na buněčný stres a metabolické funkce insulinu, jako je glykolýza a syntéza glykogenu. Jejich úloha v organismu, byť ještě ne zcela prozkoumaná, je velice podstatná. Další získané poznatky o FOXO a jejich regulaci a aktivaci by mohly přispět k dalšímu poznání mnoha nemocí a procesu stárnutí.

7 ZÁVĚR

- Pomocí bodové mutagenese jsem připravila cDNA pro expresi mutantů S149D a S149E forkhead domény lidského transkripčního faktoru FOXO4. Výsledek mutagenese byl ověřen sekvenací.
- Provedla jsem expresní test a ukázala, že připravené mutanty se v bakteriích E.coli exprimují.

SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

1. Obsil, T., Obsilova, V.: Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors, *Oncogene*, 27, 2263 – 2275 (2008)
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, London, New York (2002)
3. Weigel, D., Jakle, H.: The forkhead domain: a novel DNA binding motif of eucaryotic transcription factors? *Cell*, 63, 455 – 456 (1990)
4. Kaestner, K.H., Knochel, W., Martinez, D.: Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors, *Genes Dev*, 14, 142 – 146 (2000)
5. Furuyama, T., Nakazawa, T., Nakano, I., Mori, N.: Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and konsensus binding sequences for mouse DAF – 16 homologues, *Biochemistry*, 349, 629 – 634 (2000)
6. Burgering, B.M.: A brief introduction to FOXology, *Oncogene*, 27, 2258 – 2262 (2008)
7. 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)
8. Lai, E., Clark K.L., Burley S.K., Darnell Jr. J.: Hepatocyte nuclear factor 3/fork head or ,winged helix‘ proteins: a family of transcription factors of diverse biologic function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 10421 – 10423 (1993)
9. Weigelt, J., Kliment, I., Dahlman-Wright K., Wikstrom, M.: Solution structure of the DNA binding domain of the human forkhead transcription factor AFX (FOXO4), *Biochemistry J.*, 40, 5861 – 5869 (2001)
10. Biggs, W.H., Cavanee, W.K., Arden, K.C.: Identification and characterization of members of the FKHR (FOX O) subclass of winged-helix transcription factors in the mouse., *Mamm. Genome*, 12, 416 – 425 (2001)
11. Overdier, D.G., Porcella, A., Costa, R.H.: The DNA-binding specificity of the hepatocyte nuclear factor 3/forkhead domain is influenced by amino-acid residuem adjacent to the recognition helix, *Mol. Cell Biol.*, 14, 2755 – 2766 (1994)
12. Kaufmann, E., Muller, D., Knochel, W.: DNA recognition site analysis of *Xenopus* winged helix proteins, *J. Mol. Biol.*, 248, 239 – 254 (1995)
13. O’Brien, R.M., Granner, D.K.: Regulation of gene expression by insulin, *Physiol. Rev.*, 76, 1109 – 1161 (1996)
14. Streeper, R., Svitek C., Chapman, S., Greenbaum, L.E., Taub, R., O’Brien, R.M.: A multicomponent insulin response sequence mediates a strong repression of mouse glukose-6-phosphatase gene transcription by insulin, *J. Biol. Chem.*, 272, 11698 – 11701 (1997)
15. Boura, E., Silhan, J., Herman, P., Vecer, J., Sulc, M., Teisinger J.: Both the N-terminal loop and wing W2 of the forkhead domain of transcription factor Foxo4 are important for DNA binding, *J. Biol. Chem.*, 282, 8265 – 8275 (2007)
16. Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., Tabtiang, R.: *C elegans* mutant that livesntwice as long as wild type, *Nature*, 366, 461 – 464 (1993)
17. Burgering, B.M., Kops, G.: Cell vycpe and death kontrol: long live Forkheads, *Trends Biochem. Sci.*, 27, 352 – 360 (2002)
18. van der Horst, A., Burgering, M.T.: Stressing the role of FoxO in lifespan and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8, 440 – 450 (2007)
19. Censem, T.B.: Regulation of sterol carrier protein gene expression by the forkhead transcription factor FOXO3a, *J. Lipid Res.*, 45, 81 – 88 (2004)
20. Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.s.: Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor, *Cell*, 96, 857 – 868 (1999)
21. Dijkers, P., Medema, R. H., Lammers, J., W., Koenderman, L., Coffey, P.: Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1, *Curr. Biol.*, 10, 1201 – 1204 (2000)
22. Tang, T.: The forkhead transcription factor AFX activates apoptosis by induction of the BCL-6 transcriptional repressor, *J. Biol. Chem.*, 277, 14255 – 14265 (2002)
23. Biggs, W.H., Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavanee, W.K., Arden, K.C.: Protein dinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 7421 – 7426 (1999)
24. Brunet, A., Kanai, F., Stehn, J., Xu, J., Sarbassova, D., Frangioni, J.V.: 14 – 3 – 3 transits to the nukleus and participates in dynamic nucleocytoplasmatic transport, *J. Cell Biol.*, 156, 817 – 828 (2002)

25. Kops, G.J., de Ruiter, N.D., De Vries-Smits, A.M., Powell, D.R., Bos, J.L., Burgering, B.M.: Direkt control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B, *Nature*, 398, 630 – 634 (1999)
26. Takaishi, H., Konishi, H., Matsuzaki, H., Ono, Y., Shirai, Y., Saito, N.: Regulation of nuclear translocation of forkhead transcription factor AFX by protein kinase B, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 11836 – 11841 (1999)
27. Tang, E.D., Nunez, G., Barr, F.G., Guan, K.L.: Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt., *J. Biol. Chem.*, 274, 16741 – 16746 (1999)
28. Brownawell, A.M., Kops, G.J., Macara, I.G., Burgering, B.M.: Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX, *Mol. Cell Biol.*, 21, 3534 – 3546 (2001)
29. Nakae, J., Park, B.C., Accili, D.: Insulin stimulates phosphorylation of the forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through a Wortmannin-sensitive pathway, *J. Biol. Chem.*, 274, 15982 – 15985 (1999)
30. Tran, H., Brunet, A., Griffith, E.C., Greenberg, M.E.: The many forks in FOXO's road, *Sci. STKE*, 2003, RE5 (2003)
31. Van Der Heide, L.P., Hoekman, M.F., Amidy, M.P.: The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation, *Biochem. J.*, 380, 297 – 309 (2004)
32. Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y.: Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT 1 deacetylase, *Science*, 303, 2011 – 2015 (2004)
33. Plas, D.R., Thompson, C.B.: Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome, *J. Biol. Chem.*, 278, 12361 – 12366 (2003)
34. Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta M., Tanaka, K., Fukamizu, A.: Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteosomal degradation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 11285 – 11290 (2003)
35. Lehtinen, M.K., Yuan, Z., Boag, P.R., Yang, Y., Villen, J., Becker E.B., *et al.*: A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress response and extends life span, *Cell*, 125, 987 – 1001 (2006)