

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

---



ŠTÚDIUM MEDZIMOLEKULOVÝCH INTERAKCIÍ  
POMOCOU IZOTERMÁLNEJ TITRAČNEJ KALORIMETRIE

Study of intermolecular interactions by isothermal titration  
calorimetry

Bakalárska práca  
študijného oboru Chemie v prírodných vedách

Praha 2013

Katarína Pšenáková

## Prehlásenie

Prehlasujem, že som túto bakalársku prácu vypracovala samostatne, pod vedením školiteľov Doc. RNDr. Tomáša Obšila, PhD. a RNDr. Veroniky Obšilovej, PhD., a že som všetky použité pramene riadne citovala. Som si vedomá toho, že prípadné využitie výsledkov, získaných v tejto práci, mimo Univerzitu Karlovu v Prahe, je možné len po písomnom súhlase tejto univerzity.

V Prahe dňa 26.08.2013

---

Podpis

## Pod'akovanie

Ďakujem svojim školiteľom Doc. RNDr. Tomášovi Obšilovi, PhD. a RNDr. Veronike Obšilovej, PhD. za odborné rady a vedenie pri práci.

Ďakujem Mgr. Daliborovi Košekovi za trpezlivú pomoc pri práci v laboratóriu.

Ďakujem RNDr. Melinde Jonásovej za odbornú pomoc, návrhy a pripomienky k bakalárskej práci.

Ďakujem celému kolektívu študentov a kolegov za vytvorené priateľské prostredie.

Osobitné pod'akovanie patrí mojej rodine za poskytnuté zázemie, podporu a pochopenie.

# ABSTRAKT

Kalorimetrické metódy sa využívajú na štúdium mechanizmov regulácie a riadenia biologických procesov na molekulárnej úrovni. Izotermálna titračná kalorimetria sa používa na sledovanie tepelnej výmeny pri molekulových interakciách v prostredí s konštantnou teplotou, využívaná je najmä pre jej priamy prístup merania termodynamických parametrov spojených s formáciou komplexov. Štandardne sa metódou ITC skúmajú biochemické interakcie, ako sú interakcie typu proteín – proteín, proteín – ligand alebo enzým – substrát. Cieľom tejto práce bolo (I) osvojiť si prácu s nano izotermálnym titračným kalorimetrom, (II) pripraviť DNA-väzbovú doménu ľudského transkripčného faktora FOXO4 (FOXO4-DBD) a (III) preskúmať termodynamické aspekty interakcie medzi FOXO4-DBD a dvojvláknovej molekuly DNA (dsDNA) obsahujúcej špecifický väzbový motív. Proteín FOXO4 je jedným zo štyroch zástupcov „O“ podskupiny forkhead transkripčných faktorov FOXO, ktoré hrajú významnú rolu v mnohých bunkových procesoch, vrátane onkogenézy, alebo ochrany pred stresom a starnutím. Forkhead doména sa viaže na sekvenciu DNA obsahujúcu väzbový motív 5'-(A/C)AA(C/T)A-3' so stechiometriou 1:1. Výsledky tejto práce potvrdili, že DNA-väzbová doména FOXO4 viaže študovanú dsDNA s disociačnou konštantou  $K_D = 3,58 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Okrem väzbovej afinity boli získané aj hodnoty pre štandardnú väzbovú entalpiu a entropiu tejto interakcie.

# ABSTRACT

Calorimetric methods are used to studying the mechanism of regulation and control of biological processes at the molecular level. Isothermal titration calorimetry (ITC) is used for monitoring the heat exchange of molecular interactions in an environment with constant temperature. This method is also preferred because of its ability of direct measurement of thermodynamic parameters associated with complex formation. ITC measures mostly the energetics of biochemical reactions or molecular interactions protein–protein, protein–ligand, or enzyme–substrate. Main goals of this bachelor thesis were: (I) to acquire working skills with nano isothermal titration calorimeter; (II) to prepare the DNA-binding domain of human transcription factor FOXO4 (FOXO4-DBD); and (III) to study thermodynamic aspects of the interaction between FOXO4–DBD and the double-stranded DNA containing specific binding motif. FOXO4 protein is one of the four members of a “O” subgroup of forkhead transcription factors FOX, which play an important role in many cellular processes including stress resistance, age control and oncogenesis. Forkhead DNA-binding domain recognizes sequences containing the core motif 5'-(A/C)AA(C/T)A-3' with the binding stoichiometry 1:1. Results of this bachelor thesis show that FOXO4–DBD binds the double-stranded DNA with a dissociation constant  $K_D = 3,58 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . In addition, values of the standard enthalpy and entropy change of this interaction were obtained as well.

# OBSAH

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK .....	8
1 ÚVOD.....	9
2 LITERÁRNY PREHĽAD .....	10
2.1 Transkripčia.....	10
2.2 Forkhead transkripčné faktory.....	11
2.3 FOXO transkripčné faktory.....	12
2.3.1 Štruktúra FOXO transkripčných faktorov .....	12
2.4 Proteín-DNA interakcie .....	13
2.4.1 Interakcie FOXO proteínov s DNA .....	15
2.4.2 Metódy skúmania proteín-DNA interakcií.....	16
2.5 Izotermálna titračná kalorimetria .....	17
3 CIELE PRÁCE.....	20
4 MATERIÁLY A METÓDY .....	21
4.1 Použitý materiál.....	21
4.1.1 Chemikálie.....	21
4.1.2 Prístroje .....	22
4.1.3 Ostatný materiál .....	23
4.2 Expresia FOXO4-DBD (sekvencia 82-207) .....	24
4.3 Purifikácia proteínu FOXO4 <sub>82-207</sub> .....	26
4.3.1 Niklová chelatačná chromatografia .....	286
4.3.2 Dialýza.....	28
4.3.3 Kationovo-výmenná chromatografia .....	28

4.3.4	Gélová permeačná chromatografia .....	30
4.3.5	SDS-PAGE.....	31
4.3.6	Meranie koncentrácie proteínov vo vzorke .....	34
4.3.7	Príprava dsDNA z oligonukleotidov .....	35
4.3.8	Meranie väzbovej afinity proteínu FOXO4 <sub>82-207</sub> a DNA pomocou ITC .....	35
4.3.9	Ionizačná entalpia použitých pufrov .....	36
4.3.10	Vyhodnotenie výsledkov merania.....	37
5	VÝSLEDKY .....	39
5.1	Expresia FOXO4 <sub>82-207</sub> .....	39
5.2	Purifikácia FOXO4 <sub>82-207</sub> .....	39
5.2.1	Niklová chelatačná chromatografia .....	39
5.2.2	Katiónovo-výmenná chromatografia .....	40
5.2.3	Gélová permeačná chromatografia .....	42
5.2.4	Výtlačok purifikácie proteínu FOXO4 <sub>82-207</sub> .....	44
5.3	Vývoj a optimalizácia merania väzby FOXO4 na dsDNA .....	45
5.3.1	Kontrola prístroja .....	45
5.3.2	ITC meranie väzby FOXO4-DBD na DNA v pufre Tris-HCl .....	47
5.3.3	ITC meranie väzby FOXO4-DBD na DNA v pufre PBS .....	53
6	DISKUSIA .....	62
7	ZÁVER .....	64
8	ZOZNAM CITOVANEJ LITERATÚRY .....	65

## ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

A .....	adenín
APS .....	peroxodisíran amónny
C .....	cytozín
DNA .....	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA .....	dvojvláknová DNA
DTT .....	1,4-ditiotreitol
<i>E. coli</i> .....	<i>Escherichia coli</i>
EDTA .....	kyselina etyléndiamíntetraoctová
FOX .....	forkhead box
G .....	guanín
IPTG .....	izopropyl- $\beta$ -D-tiogalaktopyranozid
LB médium .....	médium podľa Luria-Bertaniho
mRNA .....	messenger ribonukleová kyselina
OD .....	optická denzita
PAGE .....	elektroforéza v polyakrylamidovom géle
PBS.....	roztok fosfátového pufru a NaCl
PMSF .....	fenylmetylsulfonylfluorid
RNA .....	ribonukleová kyselina
rRNA .....	ribozomálna ribonukleová kyselina
rpm .....	otáčky za minútu
SDS .....	dodecylsíran sodný
T .....	tymín
TEMED .....	N,N,N',N'-tetraetyléndiamín
Tris .....	tris(hydroxymetyl)aminometán
tRNA .....	transferová ribonukleová kyselina
$\beta$ ME .....	2-tioethanol



# 1 ÚVOD

Izotermálna titračná kalorimetria je jednou z najrýchlejšie sa rozvíjajúcich metód skúmania proteínov. V priebehu uplynulého desaťročia sa vyvinula z odbornej metódy vhodnej na pozorovanie molekulárnych interakcií a biologických procesov v bunkách na široko využiteľný postup merania všetkých typov interakcií proteínov.<sup>[1]</sup> Izotermálna titračná kalorimetria je jediná metóda, ktorá je momentálne schopná merať nielen väzbovú afinitu, ale aj zmeny dvoch termodynamických veličín: entalpiu a entropiu.<sup>[2]</sup> Nano izotermálny titračný kalorimeter dokáže detegovať teplá v rádoch nanoJoulov a tak umožňuje priame meranie asociačných procesov, ktoré vykazujú veľmi malé teplotné zmeny.<sup>[3]</sup>

Proteín FOXO4 patrí do skupiny forkhead transkripčných faktorov. Transkripčné faktory sú proteíny, ktoré sa podieľajú na regulácii transkripcie génov. Prvým zisteným nositeľom forkhead proteínov bolo embryo Drozofily obyčajnej (*Drosophila melanogaster*), kde mutácia vo forkhead géne spôsobovala nesprávne formovanie čriev v konečnom embryonálnom vývoji. Podľa toho dostali transkripčné faktory svoje pomenovanie forkhead (vidlicovitá hlava).<sup>[4]</sup>

Podskupina forkhead transkripčných faktorov „O“ zahŕňa štyri členy: proteíny FOXO1, FOXO3, FOXO4 a FOXO6, ktoré predstavujú významnú súčasť konzervovaných motívov signálnej dráhy spájajúcej rastové a stresové signály v transkripčnej kontrole. Proteín FOXO4 je najmenší z FOXO podskupiny a obsahuje asi 500 zvyškov aminokyselín. Z toho približne 110 aminokyselín vytvára špecifický DNA-väzbový motív, ktorý rozpoznáva sekvenciu DNA v tvare 5'- AAA CA -3'.<sup>[5]</sup>

Cieľom tejto bakalárskej práce bola purifikácia DNA-väzbovej domény proteínu FOXO4 so sekvenciou aminokyselín 82 – 207 a pomocou metódy izotermálnej titračnej kalorimetrie získať údaje dôležité pre pochopenie mechanizmu interakcie medzi dvojitým reťazcom DNA a proteínom FOXO4<sub>82-207</sub>. Kalorimetria poskytuje údaje o disociačnej konštante reakcie, o stechiometrii a o termodynamických veličinách reakcie.

## 2 LITERÁRNY PREHĽAD

### 2.1 Transkripcia

Génová expresia zahŕňa procesy vedúce k transformácii genetickej informácie úseku DNA do podoby finálnej bunkovej štruktúry, napríklad proteínu. Prvým krokom je transkripcia génov, biologický dej prebiehajúci v jadre buniek. Pri transkripcii sa dvojitý vlákňový reťazec deoxyribonukleovej kyseliny rozpletá rušením vodíkových väzieb a jedno vlákno (tzv. templát) vystupuje ako matrica pre pripájanie báz na princípe komplementarity. Produktom je nové vlákno RNA ako primárny transkript. Syntetizované molekuly RNA sa ďalej priamo podieľajú na tvorbe proteínov. Z troch typov RNA prítomných v bunke je ribozomálna RNA (rRNA) najrozšírenejšia a jej úlohou je spájať sa s proteínmi a vytvárať ribozómy, na ktorých následne prebieha génová translácia. Messenger RNA (mRNA) zaisťuje špecifickú sekvenciu aminokyselín vytvárajúcu daný proteín. Transferová RNA (tRNA) zaručuje prítomnosť špecifických aminokyselín v správnom poradí pri tvorbe polypeptidového reťazca.<sup>[6]</sup>

Transkripcia má tri fázy – iniciáciu, elongáciu a termináciu. Hlavným enzýmom, ktorý sa podieľa na transkripcii genetickej informácie je RNA polymeráza. V eukaryotách sa vyskytuje v troch rôznych formách označených rímskymi číslicami. DNA, ktoré zabezpečuje kódovanie proteínu, prepisuje RNA polymeráza II.<sup>[6]</sup> V prvej iniciačnej fáze transkripčné faktory a RNA polymeráza II priľnú k promótoru, sekvencii DNA označujúcej miesto začiatku transkripcie. Následne polymeráza katalyzuje vytváranie fosfodiesterovej väzby medzi časťami ribonukleotidtrifosfátov a tým vytvára molekulu RNA. Druhá elongačná fáza zahŕňa putovanie RNA polymerázy II po templáte v smere od jeho 3' konca po 5' koniec, ktorá narúša vodíkové väzby, čím sa duplex DNA ďalej rozpletá. Tretia terminačná fáza nastáva, ak polymeráza natrafí na stop kodón, ktorý vytvára trojica nukleotidov a značí koniec syntézy proteínu. Namiesto ďalšej aminokyseliny sa pripája molekula vody a vzniknutý polypeptidový reťazec sa uvoľňuje.<sup>[6, 7]</sup>

## 2.2 Forkhead transkripčné faktory

Transkripčné faktory sú proteíny, ktoré dokážu regulovať proces transkripcie. V eukaryotických bunkách prebieha regulácia transkripcie pomocou naväzovania transkripčných faktorov na regulačné úseky DNA.<sup>[8]</sup>

Bazálne transkripčné faktory ovplyvňujú RNA polymerázu II a stavajú ju do aktívnej konformácie. Následne rozoznávajú miesta naväzovania polymerázy II a tým umožňujú aktiváciu uzavretého iniciačného komplexu. Špeciálne transkripčné faktory sa naväzujú na hlavný väzbový motív špecifickej DNA sekvencie, často lokalizované ďalej od promotora.<sup>[9]</sup> Špeciálneho typu sú aj forkhead box transkripčné faktory (FOX), ktoré boli prvýkrát identifikované v roku 1989 a názov forkhead (vidlicovitá hlava) získali podľa forkhead génu mušky Drozofily obyčajnej (*Drosophila melanogaster*), kde FOX transkripčný faktor ovplyvňoval správny vývin vnútorností embrya.<sup>[10]</sup>

Proteíny z radu FOX netvorí veľkú rodinu transkripčných faktorov, ale vyznačujú sa zásadnou funkčnou rozmanitosťou. Dôležitú funkciu vykazujú vo viacerých bunkových pochodoch, uplatňujú sa najmä v bunkovom vývoji, ovplyvňujú metabolizmus buniek, proliferáciu (bunkovú multiplikáciu), diferenciáciu, apoptózu (bunkovú smrť), odolnosť voči stresu a tumorogéniu. FOX transkripčné faktory formujú uzavretú skupinu v rodine „winged helix protein“ vďaka ich špecifickej aminokyselínovej sekvencii.<sup>[8]</sup>

V roku 1990 bola objavená DNA-väzbová doména forkhead transkripčných faktorov rozpoznávajúca sekvenciu DNA v tvare 5'- AAA CA -3'. Forkhead doména je tvorená približne 110 aminokyselinami tvoriacimi špirálovitý reťazec, ktorý sa značí aj ako „okřídlený“, keďže dva cykloidy v proteínovej štruktúre domény pripomínajú motýlie krídla.<sup>[10]</sup>

Forkhead box transkripčné faktory zahrňujú 18 podskupín, ktoré označujú písmená A až R. Boli nájdené a identifikované v mnohých živočíšnych druhoch, od kvasiniek až po cicavce. Ľudské forkhead proteíny majú viac než 40 členov.<sup>[11]</sup>

## 2.3 FOXO transkripčné faktory

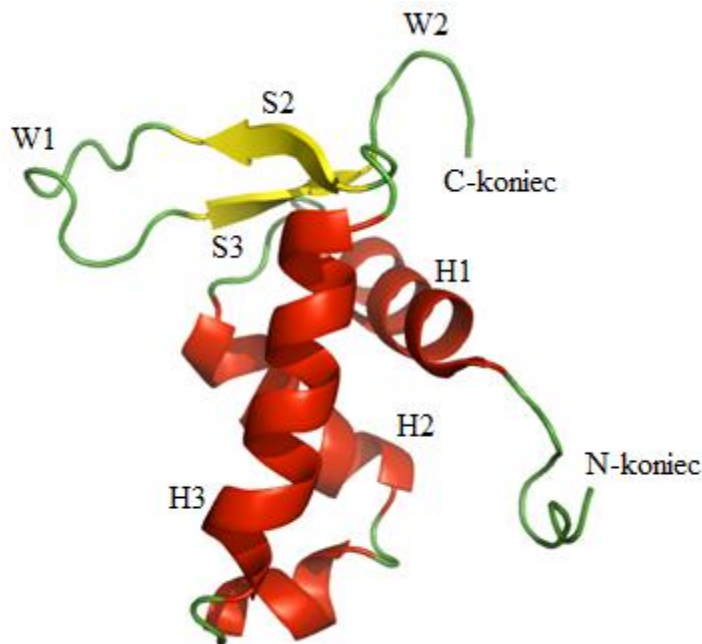
V súčasnosti je identifikovaných viac než 100 proteínov patriacich medzi forkhead box transkripčné faktory. Do podskupiny „O“ patria štyri proteíny: FOXO1, 3, 4 a 6, pôvodne identifikované v ľudskom sarkóme. V súčasnosti je zistená prítomnosť FOXO proteínov v rôznych druhoch organizmov, u hlísty *Caenorhabditis elegans*, mušky *Drosophila melanogaster*, ryby *Danio rerio*, myši, krysy i človeka.<sup>[12]</sup>

FOXO proteíny sa zúčastňujú dôležitých biologických pochodov, sú významnou súčasťou ochrany proti oxidatívne stresu, kontrolujú bunkový cyklus a metabolizmus, diferenciaciu, apoptózu a podieľajú sa na oprave chybných sekvencií DNA. Prejavovanie FOXO transkripčných faktorov je veľmi individuálne. Expresia génov FOXO1 prebieha najmä v slezine a v tukovom tkanive, FOXO3 je prítomný v mozgu a srdci, proteín FOXO4 je exprimovaný vo svaloch alebo v placentе a FOXO6 v mozgu.<sup>[11]</sup>

FOXO transkripčné faktory sú regulované proteín-proteínovými interakciami a posttranslačnými modifikáciami pri transporte z jadra do cytoplazmy. Regulácia interakcie proteínov FOXO s DNA môže nastávať priamo posttranslačnými modifikáciami v mieste DNA-väzbovej domény, alebo vytvorením špecifického väzbového motívu.<sup>[13]</sup>

### 2.3.1 Štruktúra FOXO transkripčných faktorov

Forkhead doména FOXO transkripčných faktorov obsahuje asi 110 zvyškov aminokyselín, ktorých štruktúra uvedená na obrázku 2.1. Pozostáva z troch  $\alpha$ -helixov s označením H1, H2 a H3, z troch  $\beta$ -štruktúr s označením S1, S2 a S3 a z dvoch špirálovitých reťazcov v tvare motýľích krídel (wing) W1 a W2. Medzi helixami H1 a H2 je vložené vlákno  $\beta$ -štruktúry S1. Vlákna S2 a S3 vytvárajú spolu s vláknom S1 antiparalelný stočený  $\beta$ -list a spolu s reťazcami W1 a W2 vytvárajú C-koniec. N-koncová časť DNA-väzbovej domény proteínu FOXO4 tvoria tri  $\alpha$ -helixy.<sup>[10, 14]</sup>

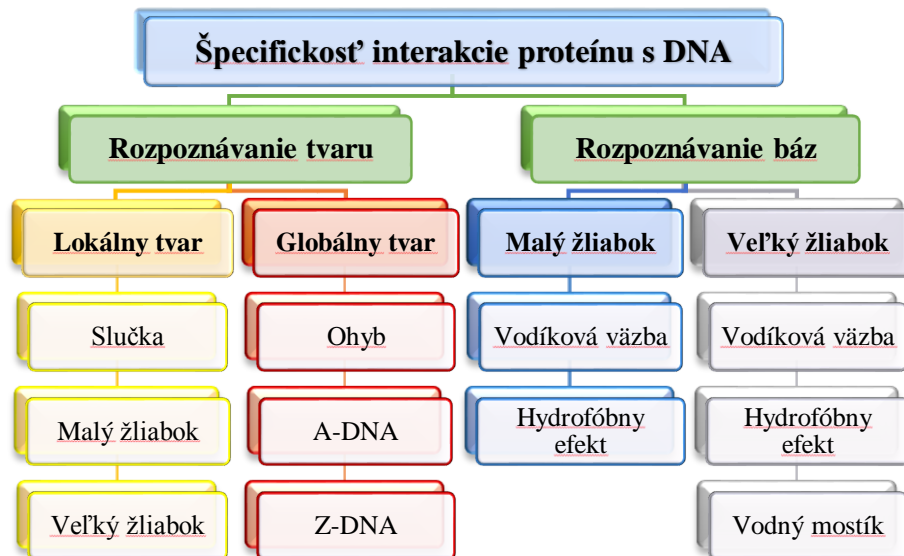


**OBR. 2.1:** Stuhová 3D reprezentácia DNA-väzbovej domény proteínu FOXO4<sub>82-181</sub>.<sup>[15]</sup>  
 Obrázok bol vytvorený pomocou programu The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC.

## 2.4 Proteín-DNA interakcie

Proteín-DNA interakcie zabezpečujú svojou jedinečnosťou mnoho biologických procesov a sú základom genetickej regulácie. Proteíny viažúce DNA sa vyznačujú vysokou špecifickosťou, čo dokazujú aj rôzne evolučne konzervované DNA-väzbové domény charakteristické pre rôzne skupiny proteínov.<sup>[16]</sup>

Proteín-DNA interakcie sú podmienené ich špecifickosťou, ktorú musia obe makromolekuly dosiahnuť vzájomným prispôbením sa, schéma mechanizmu rozpoznávania DNA proteínom je uvedená na obrázku 2.2. Proteíny môžu rozoznávať tvar DNA, s ktorou interagujú (tzv. rozpoznávanie tvaru), napríklad typ konformácie DNA, prítomnosť ohybov, či iných deformácií, hydratačný profil, alebo rozloženie elektrostatického potenciálu. Proteíny ďalej rozoznávajú aj danú sekvenciu molekúl DNA priamo podľa jej chemického zloženia (rozpoznávanie báz pomocou vodíkových väzieb a van der Waalsových interakcií).<sup>[16]</sup>



**OBR. 2.2:** Schéma mechanizmu rozpoznávania DNA proteínom.<sup>[16]</sup>

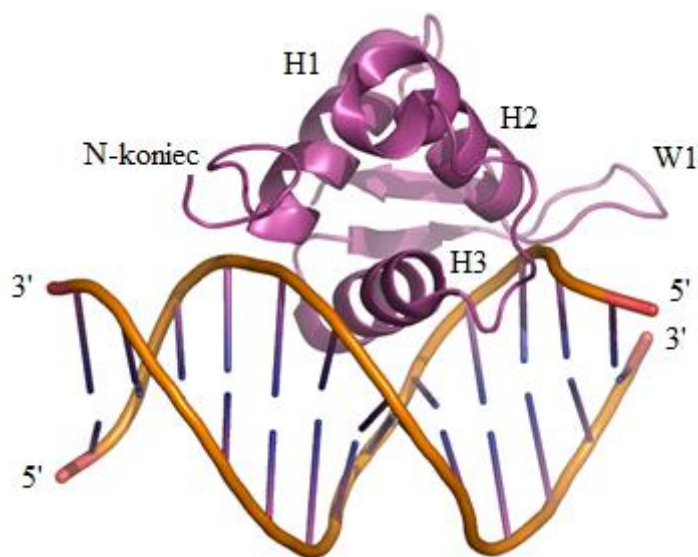
Rozpoznávanie DNA umožňujú väzbové motívy, ktoré sú špecifickými časťami štruktúry DNA (lokálne tvary), alebo motívy zahrňujúce celkový tvar usporiadaných štruktúr makromolekuly DNA (globálne tvary). Slučka sa vytvára pri deformácii lokálneho tvaru DNA na úrovni jednotlivých komplementárnych báz a vďaka tomu je ľahko identifikovateľná pre proteín. Malý žliabok je časť DNA, ktorá sa nachádza medzi glykozidovými väzbami na vnútornej strane komplementárnych báz, pričom veľký žliabok sa nachádza na vonkajšej strane. A-DNA a Z-DNA vyjadrujú rôzne formy natočenia dvojzávitnice.<sup>[17]</sup>

Vytváranie vodných mostíkov vo veľkom žliabku je spôsobené molekulami vody nachádzajúcimi sa v proteín-DNA komplexoch, ktoré sú pravdepodobne pozostatkami ich solvatačných obalov, rozpadnutých pri interakcii.<sup>[18]</sup>

## 2.4.1 Interakcie FOXO proteínov s DNA

Forkhead doména FOXO transkripčných faktorov rozoznáva DNA-väzbový motív so sekvenciou aminokyselín 5'- (A/C)AA (C/T)A -3', na ktorý sa viaže ako monomér so stechiometriou 1:1, stuhová reprezentácia komplexu DNA-väzbovej domény proteínu FOXO4 je znázornená na obrázku 2.3.<sup>[10]</sup> Ich špecifickosť interakcie s DNA vyjadruje rozoznávanie báz. Vytváraním vodíkových väzieb sa  $\alpha$ -helix H3 proteínu viaže na veľký žliabok v molekule DNA, pričom vytvorenú štruktúru stabilizujú van der Waalove interakcie a vodné mostíky. Špirálovité reťazce W1 a W2 interagujú špecificky a nešpecificky s malým i veľkým žliabkom, čím vytvárajú ďalšiu väzbu forkhead domény, ktorá spôsobuje ohyb molekuly DNA. Helix H3 je ovplyvnený ohybom DNA, čo spôsobí jeho vnorenie do zúženého veľkého žliabku. N-koncová a C-koncová časť DNA-väzbovej domény proteínu zaisťuje danú špecifickosť a je pri interakcii stabilizátorom vznikajúceho komplexu.<sup>[19]</sup>

Presný mechanizmus interakcie medzi DNA a proteínmi FOXO rodiny je zatiaľ nejasný a je podrobovaný intenzívnemu skúmaniu, vyriešené sú kryštálové štruktúry DNA-väzbových domén proteínov FOXO1, FOXO3 a FOXO4.<sup>[5, 20, 21]</sup>



**OBR. 2.3:** Stuhová reprezentácia komplexu DNA-väzbovej domény proteínu FOXO4 a sekvencie dsDNA 5'- AAA CA -3'.<sup>[5]</sup> Obrázok bol vytvorený pomocou programu The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC.

## 2.4.2 Metódy skúmania proteín-DNA interakcií

Interakcie proteínov s DNA sú súčasťou mnohých dôležitých biologických procesov. Ich mechanizmy sú predmetom dnešných výskumov, ich špecifickosť umožňuje skúmanie rôznymi metódami. Termodynamická a kinetická analýza biomolekulárnych interakcií poskytuje detaily energetických a dynamických vlastností procesov molekulárneho rozpoznávania a štruktúry vznikajúcich komplexov.<sup>[22]</sup> Medzi najčastejšie používané metódy skúmania proteín-DNA interakcií patrí metóda electrophoretic mobility shift assay (EMSA), surface plasmon resonance (SPR), imunoprecipitácia, či fluorescencia. Ďalšími možnými metódami pro štúdium proteín-DNA interakcii sú aj diferenčná kompenzačná (DSC) a izotermálna titračná kalorimetria (ITC).

EMSA je metóda retardácie elektroforetickej pohyblivosti komplexov DNA-proteín v natívnych polyakrylamidových géloch. Táto metóda je vhodná najmä ako orientačné porovnanie DNA-väzbovej afinity rôznych proteínov.

Imunoprecipitácia je imunochemická metóda, pri ktorej nastáva precipitácia bielkoviny v lyzačnom pufrí pomocou imunokomplexu. Pre štúdium interakcie medzi proteínom a DNA sa používa chromaínová imunoprecipitácia.<sup>[23]</sup>

Fluorescencia predstavuje emisiu fotónu z elektronicke excitovaného stavu. Prechod elektrónu medzi excitovaným singletovým stavom a základným excitovaným stavom je povolený a prebieha mimoriadne rýchlo. Mieru polarizácie fluorescencie vyjadruje anizotropia, ktorej meranie umožňuje štúdium biomembrán, denaturácie proteínov a asociačných rovnováh molekúl. Proteín-DNA interakcie sa sledujú meraním anizotropie vďaka fluorofóru naviazanom na DNA.<sup>[24]</sup>

SPR je metóda často využívaná pri meraní molekulových interakcií. Rezonancia povrchového plazmonu je čiastočne optický a čiastočne elektrický jav, ktorý vzniká pri odraze svetla na rozhraní kovu a dielektrika. Dopad svetelných lúčov pri určitom uhle spôsobuje prenos energie svetla na plazmóny, čiže elektróny nachádzajúce sa na povrchovej vrstve kovu. Tento prenos energie spôsobuje zmeny v uhle odrazu a poklesnutú intenzitu odrazových lúčov. Proteín-DNA interakcie sa sledujú metódou SPR vďaka lineárnej závislosti medzi posunom uhla odrazu a koncentráciou proteínov.<sup>[25]</sup>



Kalorimetria je fyzikálna metóda zaoberajúca sa meraním zmien tepla. Medzi kalorimetrické techniky patrí diferenčná kompenzačná (DSC) a izotermálna titračná kalorimetria (ITC). DSC je metóda merajúca rozdiely v dodaných energiách potrebných na ohrev pri zmene teplôt vzorky a referenčnej látky v závislosti na teplote alebo čase, pričom meniacu sa teplotu zaznamenáva ako nezávisle premennú. Izotermálna titračná kalorimetria prebieha vždy pri konštantnej teplote.<sup>[3]</sup>

## 2.5 Izotermálna titračná kalorimetria

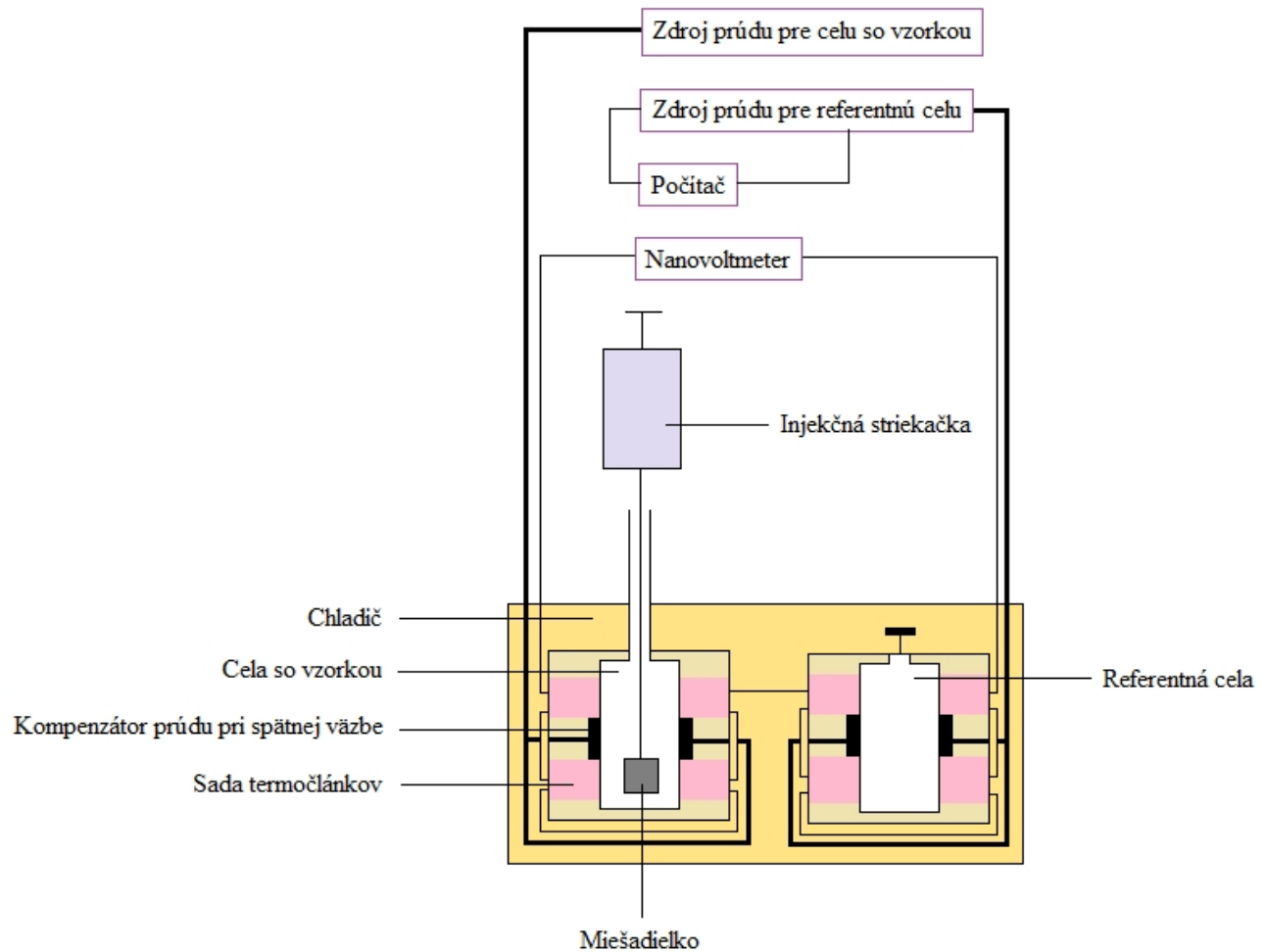
Kalorimetrické metódy sa používajú na určovanie termodynamických veličín od roku 1960.<sup>[26]</sup> Za posledné desaťročia sa izotermálna titračná kalorimetria vyvinula zo špecializovanej metódy určenej k pochopeniu molekulových interakcií na rozšírený spôsob skúmania všetkých typov interakcií proteínov. ITC poskytuje priamu cestu k úplnej termodynamickej charakterizácii proteínových interakcií.<sup>[1]</sup>



**OBR. 2.4:** Nano Izotermálny Titračný Kalorimeter používaný na meranie proteín-DNA interakcií od firmy TA Instruments.

Okrem určovania väzbových afínít reakcií, ITC sleduje aj zmeny entalpie a entropie, ktoré môžu byť použité ako predloha pre molekulové modelovanie. Schopnosťou merať rôzne energetické príspevky poskytuje kalorimetria prepojenie medzi počítačovou a experimentálnou analýzou. Vzhľadom k presnosti, citlivosti a spoľahlivosti jednotlivých meraní sa predpokladá dôležitá úloha tejto metódy vo vývoji molekulového dizajnu liečiv.<sup>[2]</sup>

ITC meria energiu spojenú s chemickou reakciou zmiešaním dvoch reaktantov. Experiment prebieha postupným pridávaním reaktantu zo striekačky vsadenej v byrete do druhého reaktantu v cele prístroja, schéma izotermálneho titračného kalorimetra je uvedená na obrázku 2.5. Metóda pracuje na princípe kompenzácie tepla, meraný signál, čiže odpoveď prístroja je veľkosť energie potrebnej k udržovaniu konštantného teplotného rozdielu medzi celou s prebiehajúcou reakciou a referentnou celou. Zmena tepla, ktorá nastáva po každej injekcii, je určená plochou jednotlivých pík.



**OBR. 2.5:** Schéma izotermálneho titračného kalorimetra.<sup>[3]</sup> Prístroj obsahuje referentnú celu naplnenú deionizovanú vodu, ktorá má po dobu celého merania konštantnú teplotu 25 °C, pri ktorej je aj prístroj kalibrovaný. Cela so vzorkou obsahuje navyše malé miešadielko nachádzajúce sa na konci striekačky, z ktorej sa pomaly pridáva do cely reaktant. Obe cely obklopuje kompenzátor prúdu a sada termočlánkov, ktoré sa starajú o udržiavanie teploty vzorky na 25 °C a vysielajú signál o zmene tepla medzi jednotlivými celami, ktorý spracováva počítač.<sup>[3]</sup>

### 3 CIELE PRÁCE

- Teoretické i praktické osvojenie metódy izotermálnej titračnej kalorimetrie s prístrojom NANO ITC - isothermal titration calorimeter od firmy TA Instruments.
- Expresia a purifikácia DNA-väzbovej domény ľudského forkhead transkripčného faktoru FOXO4 (sekvencia 82-207).
- Vývoj a optimalizácia metódy ITC pre štúdium interakcie medzi dsDNA a proteínom FOXO4<sub>82-207</sub>.

# 4 MATERIÁLY A METÓDY

## 4.1 Použitý materiál

### 4.1.1 Chemikálie

1,4-ditiotreitol.....	Carl Roth (Nemecko)
ampicilín.....	Sigma (USA)
β-merkaptoetanol.....	Sigma (USA)
azid sodný.....	Sigma (USA)
bromfenolová modrá.....	Aldrich (Nemecko)
Coomassie Brilliant Blue R 250.....	Lachema a.s. (ČR)
dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného.....	Lachema a.s. (ČR)
dihydrogenfosforečnan draselný.....	Lachema a.s. (ČR)
DNA oligonukleotidy.....	Lachema a.s. (ČR)
EDTA.....	Carl Roth (Nemecko)
etanol.....	Penta (ČR)
glycerol.....	Lachema a.s. (ČR)
glycín.....	Carl Roth (Nemecko)
hydroxid sodný.....	Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
chlorid draselný.....	Lachema a.s. (ČR)
chlorid sodný.....	Carl Roth (Nemecko)
imidazol.....	Carl Roth (Nemecko)
IPTG.....	Sigma (USA)
izopropanol.....	Lachema a.s. (ČR)
kyselina citrónová.....	Lachema a.s. (ČR)
kyselina chlorovodíková.....	Lachema a.s. (ČR)
kyselina octová.....	Lachema a.s. (ČR)
LB médium.....	Carl Roth (Nemecko)
lyzozým.....	Carl Roth (Nemecko)

metanol.....	Lachema a.s. (ČR)
PMSF .....	Sigma (USA)
SDS .....	Sigma (USA)
TEMED .....	Carl Roth (Nemecko)
Tris.....	Carl Roth (Nemecko)

## 4.1.2 Prístroje

Centrifuga SIGMA 8K (rotor 12510-H).....	Sigma (Nemecko)
Centrifuga HERMLE Z323K.....	Hermle (Nemecko)
Centrifuga 5804 R (rotor A-4-44) .....	Eppendorf (Nemecko)
HPLC AKTA .....	Amersham Biosciences (Švédsko)
inkubátor HT Multitron.....	Infors (Švajčiarsko)
inkubátor Shaking Incubator NB-205 .....	N-Biotek (Kórea)
laboratórne váhy HF-200g.....	And (USA)
magnetická miešačka Variomag Maxi, Komet....	Thermo Scientific (USA)
peristaltická pumpa .....	IDEX (Švajčiarsko)
pH meter JenWay 3505 .....	Felsted (Veľká Británia)
sonikátor Sonicator 3000 Misonix .....	Cole-Parmer (USA)
spektrofotometer Agilent 8453 .....	Agilent (USA)
Termoblok .....	Grant (Anglicko)
vertikálna polyakrylamidová elektroforéza.....	BioRad (USA)
Vortex Zx3.....	Velp Scientifica (Taliansko)

### 4.1.3 Ostatný materiál

automatické pipety .....	Eppendorf (Nemecko)
benzamidín-sepharosa .....	Amersham Biosciences (Švédsko)
centrifugačné skúmavky .....	Carl Roth (Nemecko)
Chelating Sepharose Fast Flow .....	GE Healthcare (Švédsko)
dialyzačná membrána (typ 27/32).....	Carl Roth (Nemecko)
<i>E. coli</i> kmeň BL21(DE3).....	Stratagene (USA)
filtre SPARTAN 13/0,45 RC .....	Whatman (Nemecko)
kolóna Superdex 200 (10/300 GL) .....	Amersham Biosciences (Švédsko)
koncentrátory Amicon Ultra.....	Millipore (USA)
kremenné kvety.....	Agilent (USA)
laboratórne sklo.....	Simax (ČR)
mikroskúmavky .....	P-Lab, a.s. (ČR)
nylonové filtre (0,45 µm) .....	Whatman (Nemecko)
Precision Plus Protein Dual Color Standard .....	BioRad (USA)
SP sepharose .....	Amersham Biosciences (Švédsko)
striekačky.....	B. Braun (Nemecko)
špičky na automatické pipety .....	Axygen (USA)

## 4.2 Expresia FOXO4-DBD (sekvencia 82-207)

Expresia FOXO4 vychádzala z glycerolového zásobníka *E. coli*, ktorý obsahoval 300  $\mu\text{l}$  glycerolu a 700  $\mu\text{l}$  bakteriálnej kultúry *E. coli* BL21(DE3) s plazmidom pET15b so zaklonovaným génom FOXO4<sub>82-207</sub>.

Do troch pripravených skúmaviek sa pridalo 10  $\mu\text{l}$  glycerolového *E. coli* zásobníka, každá skúmavka pritom obsahovala 5 ml sterilného média podľa Luria-Bertaniho (LB médium) s pridaným ampicilínom o finálnej koncentrácii 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Všetky skúmavky sa nechali cez noc (15 hodín) trepať v trepačke s teplotou 37 °C pri 200 rpm. Narastená kultúra v každej skúmavke sa postupne preniesla do troch pripravených Erlenmayerových baniek, ktoré obsahovali 900 ml LB média s laboratórnou teplotou a s pridaným ampicilínom o finálnej koncentrácii 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . V inkubácii bunkových kultúr pri teplote 37 °C a 200 rpm sa pokračovalo, až kým optická denzita (OD) nedosiahla hodnotu 0,8  $\text{cm}^{-1}$  pri vlnovej dĺžke 600 nm. Následne sa znížila teplota na 20 °C a pridal sa induktor IPTG o finálnej koncentrácii 1  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Kultúry so zahájenou proteosyntézou sa nechali cez noc trepať pri 20 °C a 200 rpm. Na druhý deň sa pokračovalo s centrifugáciou, kultúra sa preliala do troch 900 ml kyviet, ktoré sa vložili do centrifugy pri 4 °C a 3400 rpm, po dobu 20 minút. Každá kyveta, obsahujúca pelety s baktériami, sa resuspendovala pomocou intenzívneho miešania s približne 30 ml vychladeného lyzačného pufru, do celkového objemu 100 ml. Do zhomogenizovaných roztokov bakteriálnych kultúr sa za stáleho miešania pri teplote 4 °C pridal inhibítor proteáz SIGMAFAST S8830 vo forme tabletky, rozpustený v 1 ml destilovanej vody, ďalej inhibítor serínových proteáz, 1 ml 100 mM zásobného roztoku PMSF v etanole s finálnou koncentraciou 1  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  a 10 mg lyzozýmu s finálnou koncentraciou 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Následne bola prevedená sonikácia pri teplote 4 °C, kumulatívny ON čas: 18 minút, 15 sekúnd ON / 30 sekúnd OFF, pri výkone 55 W. Za účelom oddelenia sonikátu a buniek sa roztoky centrifugovali, 45 minút pri teplote 4 °C a 14 500 rpm. Po ukončení centrifugácie sa proteín nachádzal v cytozolárnej frakcii (supernatant) a takto pripravený proteín sa ďalej purifikoval.



## Zloženie pufrov:

### 10× PBS pufo

látka	odmerané množstvo
NaCl	80 g
KCl	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	14,4 g
NaN <sub>3</sub>	0,4 g

Do objemu 1 l doplnené deionizovanou vodou.

pH upravené na hodnotu 7,4 pomocou 10 M NaOH.

### Lyzačný pufo

látka	odmerané množstvo	výsledná koncentrácia
PBS	10 ml 10× PBS	1×
NaCl	5,84 g	1 mol·dm <sup>-3</sup>
βME	27,8 μl	4 mmol·dm <sup>-3</sup>
imidazol	0,014 g	2 mmol·dm <sup>-3</sup>

Do objemu 100 ml doplnené deionizovanou vodou.

## 4.3 Purifikácia proteínu FOXO4<sub>82-207</sub>

### 4.3.1 Niklová chelatačná chromatografia

Niklová chelatačná chromatografia je fyzikálno-chemická separačná metóda, patriaca do skupiny afinitných chromatografií. Jej podstatou je schopnosť vytvárania stabilného reverzibilného komplexu nikelnatých iónov a histidínu. Proteín obsahuje histidíny na jednom z jeho koncov vo forme pripojeného polyhistidín-tagu (6× His-tag).

Kolóna niklovej chelatačnej chromatografie obsahovala ako nosič Chelating Sepharose Fast Flow. Nosič prichytil Ni<sup>2+</sup> ióny, na ktoré sa selektívne viazali molekuly proteínu, zatiaľ čo ostatné molekuly kolónou prechádzali bez zachytávania.

Kolóna naplnená sefarózou bola pre zbavenie sa prípadných nečistôt premytá nasledujúcimi roztokmi v danom poradí: 15 ml destilovanej vody, 15 ml roztoku Stripp, 20 ml destilovanej vody, 60 ml 0,1 M roztok NiSO<sub>4</sub>, 15 ml destilovanej vody, 15 ml pufru E. Následne sa na kolónu naniesol purifikovaný proteín FOXO4<sub>82-207</sub> obsahujúci His-tag. Kolóna s naviazaným proteínom bola ďalej premytá 50 ml vychladeného pufru E a 300 ml vychladeného roztoku 10% pufru F v pufri E pre oddelenie slabšie a nešpecificky naviazaných bielkovín. Elúcia proteínu bola prevedená 20 ml 75% pufrom F v pufri E, frakcie boli zbierané do eppendorfiiek s objemom 1,5 ml pri teplote 4°C.

#### Zloženie regeneračného roztoku Stripp:

látka	výsledná koncentrácia
NaCl	500 mmol·dm <sup>-3</sup>
EDTA	50 mmol·dm <sup>-3</sup>

### Zloženie pufrův pre niklovú chelatačnú chromatografiu:

#### Pufor E:

látka	odmerané množstvo	výsledná koncentrácia
PBS	50 ml 10× PBS	1×
NaCl	14,6 g	0,5 mol·dm <sup>-3</sup>
βME	70 μl	2 mmol·dm <sup>-3</sup>
imidazol	0,035 g	1 mmol·dm <sup>-3</sup>

Do objemu 0,5 l doplnené deionizovanou vodou.

Zloženie 10× PBS pufru je na strane 25.

#### Pufor F:

látka	odmerané množstvo	výsledná koncentrácia
PBS	50 ml 10× PBS	1×
NaCl	14,6 g	0,5 mol·dm <sup>-3</sup>
βME	70 μl	2 mmol·dm <sup>-3</sup>
Imidazol	20,4 g	0,6 mol·dm <sup>-3</sup>

Do objemu 0,5 l doplnené deionizovanou vodou.

pH upravené na hodnotu 9,0 pomocou koncentrovanej HCl.

Zloženie 10× PBS pufru je na strane 25.

### 4.3.2 Dialýza

Dialýza je metóda oddeľovania jednotlivých látok podľa veľkosti ich molekúl.

V procese purifikácie proteínu sa vkladá roztok proteínu do dialyzačnej polopriepustnej membrány, ktorej póry majú menšiu veľkosť, ako je veľkosť molekúl proteínu. Proteín ostane uzavretý v membráne, ktorá je umiestnená v dialyzačnom pufrí. Molekuly menšie, ako je veľkosť pórov v membráne, podliehajú samovoľnej difúzii v smere gradientu elektrochemického potenciálu cez polopriepustnú membránu do dialyzačného pufru. Proteín je následne k dispozícii rozpustený v prostredí použitého dialyzačného pufru.

#### Zloženie dialyzačného pufru:

látka	odmerané množstvo	výsledná koncentrácia
kyselina citrónová	10,5 g	50 mmol·dm <sup>-3</sup>
EDTA	4 ml 0,5 M EDTA	2 mmol·dm <sup>-3</sup>
DTT	0,31 g	2 mmol·dm <sup>-3</sup>

Do objemu 1 l doplnené deionizovanou vodou.

pH upravené na hodnotu 6,3 pomocou 10 M NaOH.

### 4.3.3 Katiónovo-výmenná chromatografia

Iónovo-výmenná chromatografia je metóda oddeľovania molekúl podľa ich kladného alebo záporného povrchového náboja. Molekuly proteínov sa značne líšia vo vlastnostiach jednotlivých nabitých skupín a vykazujú rôzne stupne interakcie s nabitými chromatografickými médiami podľa rozdielov v povrchovom rozložení a hustote náboja. V kolóne používanej na katiónovo-výmennú chromatografiu sa na nosiči nachádzajú elektrostaticky viazané katióny, ktoré sa v procese výmeny reverzibilne nahrádzajú katiónmi z privádzaného roztoku proteínu. Kladný náboj proteínu je zabezpečený v prostredí pufru, ktorého pH je nižšie ako pI proteínu.

Proteín FOXO4<sub>82-207</sub>, s teoretickou hodnotou pI = 10,53 bol rozpustený v prostredí použitého dialyzačného pufru, ktorého pH bolo cielene upravené na 6,3. Následne bol proteín počas kationovo-výmennnej chromatografie zachytený v kolóne Superdex 200, ktorá bola premytá a ekvilibrovaná pufrom E. Eluovanie proteínu z kolóny bolo dosiahnuté stúpajúcim gradientom iónovej sily po privedení pufru F, obsahujúceho soľ.

### Zloženie pufrův pre kationovo-výmennú chromatografiu:

#### Pufor E:

látka	odmerané množstvo	výsledná koncentrácia
kyselina citrónová	5,26 g	50 mmol·dm <sup>-3</sup>
EDTA	1 ml 0,5 M EDTA	1 mmol·dm <sup>-3</sup>
DTT	0,154 g	2 mmol·dm <sup>-3</sup>

Do objemu 0,5 l doplnené deionizovanou vodou.

pH upravené na hodnotu 6,3 pomocou 10 M NaOH.

#### Pufor F:

látka	odmerané množstvo	výsledná koncentrácia
kyselina citrónová	5,26 g	50 mmol·dm <sup>-3</sup>
EDTA	1 ml 0,5 M EDTA	1 mmol·dm <sup>-3</sup>
DTT	0,154 g	2 mmol·dm <sup>-3</sup>
NaCl	29,22 g	1 mol·dm <sup>-3</sup>

Do objemu 0,5 l doplnené deionizovanou vodou.

pH upravené na hodnotu 6,3 pomocou 10 M NaOH.

#### 4.3.4 Gélová permeačná chromatografia

Gélová permeačná chromatografia (*Size Exclusion Chromatography*) je metóda oddeľovania molekúl na základe ich hydrodynamického objemu. Jej podstatou je v kolóne prebiehajúca difúzia molekúl rozpustenej látky do zrnitého pórovitého gélu. Látky, ktoré majú väčšie molekuly, ako je veľkosť pórov gélu, sa kolónou pohybujú bez prekážok a sú vyeluované ako prvé. Na druhej strane menšie molekuly sú zadržované pórmí gélu a preto sa v kolóne pohybujú najpomalšie.<sup>[27]</sup>

Gélová permeačná chromatografia proteínu FOXO4 bola prevedená v prítomnosti dvoch rôznych pufov s označením pufo I a II, pričom pufo I obsahoval Tris-HCl a pufo II PBS. Zloženie pufov je uvedené nižšie.

Roztok proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> bol zakoncentrovaný na objem 1,5 ml a prefiltrovaný na filtri s veľkosťou pórov 0,45  $\mu\text{m}$ . Následne bol podrobený gélovej permeačnej chromatografii pre odstránenie nežiadúcich zvyškov iných bielkovín a nečistôt. Bola použitá kolóna Superdex 200, premytá a ekvilibrovaná pufo I alebo II. Proteín bol teda rozpustený v prostredí daného pufru a následne pripravený na meranie.

##### **Zloženie pufru pre gélovú chromatografiu a ITC:**

##### **Pufo I (Tris-HCl):**

látka	odmerané množstvo	výsledná koncentrácia
Tris-HCl pH 7,5	20 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5	20 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$
NaCl	5,84 g	100 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$

Do objemu 0,5 l doplnené deionizovanou vodou.

## **Pufor II (PBS):**

látka	odmerané množstvo
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1,44 g
NaN <sub>3</sub>	0,04 g

Do objemu 1 l doplnené deionizovanou vodou.

pH upravené na hodnotu 7,4 pomocou 10 M NaOH.

### **4.3.5 SDS-PAGE**

SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) patrí medzi elektromigračné separačné analytické metódy, ktorej princíp je založený na rozdielnej migračnej rýchlosti elektricky nabitých častíc v elektrickom poli. Rýchlosť pohybu molekúl priamo závisí na veľkosti ich náboja a nepriamo na veľkosti ich častíc. Polyakrylamidový gél zabezpečuje gélovú filtráciu, ktorá usmerňuje a rozdeľuje pohyb rôznych typov molekúl podľa ich tvaru a veľkosti v prostredí gélu. SDS, čiže dodecylsulfát sodný, je molekula schopná vytvárať záporný náboj v proteínoch a to spôsobom denaturácie proteínu. Terciárna štruktúra bielkovín je závislá na priestorovom usporiadaní polypeptidového reťazca, ktoré sa ale v prítomnosti molekúl SDS mení vytváraním komplexu proteín-SDS. Táto zmena následne spôsobuje, že záporný elektrický náboj molekuly SDS je pridelený i proteínu, pričom v prítomnosti elektrického poľa sa takto nabité proteíny pohybujú približne rovnakou rýchlosťou a rozlišuje sa len ich schopnosť pohybu medzi časticami gélu.<sup>[28]</sup>

Pohyb veľkých molekúl je značne obmedzený prekážkami v podobe častíc gélu, naopak malé molekuly sa dokážu pomerne rýchlo pohybovať aj medzi inými časticami.

Napätie v priebehu elektroforézy činilo 180 V, používal sa zavádzací 5 % separačný 15 % polyakrylamidový gél, ktorého veľkosť pórov umožňovala dostatočný pohyb molekúl proteínu.

Analýza SDS-PAGE bola použitá na vizualizáciu degradácie proteínov, a to po každom kroku zahŕňajúcom metódu chromatografie v purifikačnom procese proteínu. Z daných frakcií sa odobralo 20  $\mu$ l vzorky a pridalo sa k nim 5  $\mu$ l vzorkovacieho pufru. Následne bolo potrebné zahriatie zmesi na 100 °C, dopomáhajúc degradácii proteínu a tým pádom i ľahšieho naväzovania SDS. Pre identifikáciu molekulových hmotností proteínu sa vždy ako prvý nanášal Precision Plus Protein Dual Color Standard, ktorý obsahoval úseky s relatívnymi molekulovými hmotnosťami  $250 \cdot 10^3$ ,  $150 \cdot 10^3$ ,  $100 \cdot 10^3$ ,  $75 \cdot 10^3$ ,  $50 \cdot 10^3$ ,  $37 \cdot 10^3$ ,  $25 \cdot 10^3$ ,  $20 \cdot 10^3$ ,  $15 \cdot 10^3$  a  $10 \cdot 10^3$ . Po ukončení elektroforézy sa pre vizualizáciu proteínov gély inkubovali po dobu 10 minút pri zvýšenej teplote v roztoku obsahujúcom farbivo Coomassie Brilliant Blue R 250, po čom nasledovala inkubácia v odfarbovacom roztoku pri zvýšenej teplote po dobu jednej hodiny.

#### **Zloženie vzorkovacieho pufru:**

látka	odmerané množstvo
1 M Tris-HCl, pH 6,8	0,6 ml
50% glycerol	5 ml
10% SDS	2 ml
$\beta$ ME	0,5 ml
1% bromfenolová modrá	1 ml
deionizovaná voda	0,9 ml

#### **Zloženie zavádzacieho gélu:**

látka	odmerané množstvo
Rotiphorese Gel 30	0,500 ml
pufor pro zavádzací gél	1,000 ml
deionizovaná voda	2,250 ml
10% (w/v) APS	0,045 ml
TEMED	0,005 ml



**Zloženie pufra pre zavádzací gél:**

látka	odmerané množstvo
1 M Tris-HCl, pH 6,8	50 ml
10% SDS	4 ml

Do objemu 100 ml doplnené deionizovanou vodou.

**Zloženie separačného gélu:**

látka	odmerané množstvo
Rotiphorese Gel 30	6,000 ml
pufor pre separačný gél	3,000 ml
deionizovaná voda	2,880 ml
10% (w/v) APS	0,100 ml
TEMED	0,012 ml

**Zloženie pufra pre separačný gél:**

látka	odmerané množstvo
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	75 ml
10% SDS	4 ml

Do objemu 100 ml doplnené deionizovanou vodou.

**Zloženie elektroforetického pufra:**

látka	výsledná koncentrácia
Tris-HCl, pH 8,3	50 mmol·dm <sup>-3</sup>
glycín	385 mmol·dm <sup>-3</sup>
SDS	0,1 %

**Zloženie farbiaceho roztoku:**

látka	odmerané množstvo
Coomassie Brilliant Blue R 250	1 g
metanol	450 ml
kyselina octová	100 ml

Do objemu 1 l doplnené deionizovanou vodou.

**Zloženie odfarbujúceho roztoku:**

látka	odmerané množstvo
metanol	100 ml
kyselina octová	100 ml

Do objemu 1 l doplnené deionizovanou vodou.

#### 4.3.6 Meranie koncentrácie proteínov vo vzorke

Prítomnosť, čistota a približné množstvo proteínu bolo skontrolované analýzou SDS-PAGE, koncentrácia proteínu vo vzorke sa stanovovala metódou merania absorbancie, využívajúc Lambert-Beerov vzťah. Užitý molárny absorpčný koeficient proteínu bol zistený pomocou programu ProtParam na stránke [www.expasy.org](http://www.expasy.org). Absorbancia vzorky sa merala spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 280 nm, referentnú vzorku predstavoval pufoer I, prípadne II pre gélovú permeačnú chromatografiu a ITC, v ktorom bol proteín po poslednom kroku v purifikačnom procese rozpustený.

### 4.3.7 Príprava dsDNA z oligonukleotidov

#### Použité oligonukleotidy

IRE-1: 5'- CTA TCA AAA CAA CGC -3'

IRE-2: 5'- GCG TTG TTT TGA TAG -3'

Synteticky vyrobené jednovláknové reťazce DNA sa rozpustili v pufrí I, prípadne II pre gélovú chromatografiu a ITC na finálnu koncentráciu dsDNA 2 mmol·dm<sup>-3</sup>. Denaturácia rozpustených oligonukleotidov sa dosiahla zahriatím na 100°C po dobu 30 minút, následné naviazanie dvoch komplementárnych reťazcov prebiehalo pomalým chladnutím. Skutočná koncentrácia dsDNA sa stanovovala spektrofotometricky podľa Lambert-Beerovho zákona, molárny absorpčný koeficient dvojvláknovej DNA pri vlnovej dĺžke 260 nm sa zistil pomocou softvéru IDT Integrated DNA Technologies na internetovej stránke [www.biophysics.idtdna.com](http://www.biophysics.idtdna.com). Referentnou vzorkou bola vzorka pufru I, prípadne II pre gélovú permeačnú chromatografiu a ITC, v ktorom boli oligonukleotidy rozpustené.

### 4.3.8 Meranie väzbovej afinity proteínu FOXO4<sub>82-207</sub>

#### a DNA pomocou ITC

Izotermálna titračná kalorimetria meria tepelnú energiu spojenú s interakciou dvoch zložiek, ktoré spolu tvoria komplex. V momente ich interakcie dochádza k uvoľneniu alebo spotrebe tepla, ktoré meriame pomocou kalorimetra. Väzbové procesy, ktoré vznikajú v cele pri každom vstreknutí reaktantu umiestneného v striekačke, spôsobujú zmenu vo väzbovom teple  $q_i$  po  $i$ -tej injektáži, ktoré sa vypočíta podľa vzťahu: <sup>[2]</sup>

$$q_i = v \cdot \Delta H_{\text{obs}} \cdot \Delta L_i \quad (1)$$

kde  $v$  je objem cely, v ktorej sa reakčná zmes nachádza,  $\Delta H_{\text{obs}}$  predstavuje entalpiu vznikajúcej väzby a  $\Delta L_i$  označuje zmenu koncentrácie ligandu po  $i$ -tej injektáži. <sup>[2]</sup>

Uvoľňujúce sa teplo z interakcie medzi proteínom a DNA sa pohybuje v rádoch mikrojoulov, aj preto je nutné dôsledne ustáliť základnú líniu (tzv. *baseline*). Čistota väzbovej cely a striekačky kalorimetra sa testuje skúšobnou titráciou vody, pričom sa v cele aj v striekačke nachádza deionizovaná voda. V tomto prípade sa teda meria zried'ovacie teplo molekúl H<sub>2</sub>O a podľa kolísania signálu z kalorimetra sa overuje funkčnosť prístroja. Pred samotným meraním je potrebné zbaviť reaktanty pevných (napríklad prachových) častíc centrifugáciou pri vysokých otáčkach a na zabránenie tvorby bublín je nutné odplynenie.

Metóda izotermálnej titračnej kalorimetrie pozostáva z dvoch krokov. Temperovanie vzoriek na jednotnú teplotu a ustálenie základnej línie v rozmedzí nastavených parametrov pre relatívne odchýlky je nasledované meraním hodnôt reakčného tepla pri priamej titrácii. Do cely bolo vstreknutých 250 µl roztoku DNA v pufrí I, prípadne II pre gélovú chromatografiu a ITC, striekačka pre izotermálnu titračnú kalorimetriu obsahovala 50 µl proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> rozpusteného v pufrí I, prípadne II pre gélovú chromatografiu a ITC. Na konci titrácie sa molárny pomer DNA ku proteínu zvolil 2:1, koncentračný rozsah pre proteín FOXO4<sub>82-207</sub> bol 0,300 mM – 0,900 mM a pre dsDNA 0,010 mM – 0,200 mM.

#### 4.3.9 Ionizačná entalpia použitých pufrův

Izotermálna titračná kalorimetria je citlivá metóda zachycujúca i rôzne protonizačné deje prebiehajúce v cele. Pri vyhodnotení vplyvu protonizácie na zmenách tepla proteín-DNA interakcií sa musí brať do úvahy najmä povaha použitého pufru.

V prípade ak sú vznikajúce väzby medzi molekulami spojené so zmenou stavu protonizácie systému, nameraný teplotný signál obsahuje i tepelnú zložku zmeny ionizačnej energie pufru. Ak vytvorenie novej väzby zmení protonizačný stav voľného alebo viazaného ligandu či komplexu makromolekuly, dôjde k prenosu protónu z pufru, počet týchto protónov označuje  $n_{H^+}$ .<sup>[29]</sup> V dôsledku toho bude zmena tepla z protonizácie prispievať k celkovej zmene tepla väzby interakcie a celková (pozorovateľná) väzbová entalpia interakcie  $\Delta H_{obs}$  bude závisieť aj na ionizačnej entalpii pufru  $\Delta H_i$ .<sup>[29, 30, 31]</sup>

$$\Delta H_{\text{obs}} = \Delta H + n_{\text{H}^+} \Delta H_i \quad (2)$$

Na sledovanie vplyvu ionizácie pufru na interakciu proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> s dsDNA boli použité dva rozdielne pufré, pufor Tris-HCl s vysokou ionizačnou energiou (49,75 kJ·mol<sup>-1</sup>) a pufor PBS s nízkou ionizačnou energiou (5,12 kJ·mol<sup>-1</sup>).<sup>[31]</sup>

### 4.3.10 Vyhodnotenie výsledkov merania

Metódou izotermálnej titračnej kalorimetrie získame experimentálne hodnoty rady termodynamických parametrov: rovnovážna konštanta  $K$ , reakčnej entalpie  $\Delta H$ , Gibbsovej energie  $\Delta G$ , reakčnej entropie  $\Delta S$  a hodnoty parametru  $n$  (3), ktorý vyjadruje pomer naviazania DNA na proteín Prot. Na vyhodnotenie zmeraných hodnôt sa používal tzv. *Independent Site Model*, ktorý vyhovoval chemickej rovnici: <sup>[26]</sup>



$$n = \frac{\text{DNA}}{\text{Prot}} \quad (4)$$

Prípad, kedy sa na proteíne nachádza jedno väzbové miesto, na ktoré sa naviaže jedna molekula DNA, zodpovedá interakcii medzi proteínom FOXO4<sub>82-207</sub> a dsDNA. Rovnovážna konštanta danej chemickej reakcie je daná podielmi rovnovážnych koncentrácií: <sup>[26]</sup>

$$K = \frac{[\text{DNA-Prot}]}{[\text{DNA}][\text{Prot}]} \quad (5)$$

pričom rovnovážna konštanta ostáva počas experimentu rovnaká, zatiaľ čo rovnovážne koncentrácie sa s prebiehajúcou titráciou neustále menia, popisujúc celkové koncentrácie proteínu a DNA. <sup>[26]</sup>

$$c_P = [\text{Prot}] + [\text{DNA-Prot}] \quad (6)$$

$$c_{\text{DNA}} = [\text{DNA}] + n[\text{DNA-Prot}] \quad (7)$$

$$K = \frac{[\text{DNA-Prot}]}{(c_P - [\text{DNA-Prot}])(c_{\text{DNA}} - n[\text{DNA-Prot}])} \quad (8)$$

Po predpoklade, že experiment prebieha za konštantného atmosférického tlaku, je pre produkované alebo spotrebované teplo platný vzťah: <sup>[26]</sup>

$$\Delta q = v \cdot \Delta H \cdot n \cdot [\text{DNA-Prot}] \quad (9)$$

# 5 VÝSLEDKY

## 5.1 Expresia FOXO4<sub>82-207</sub>

Expresia a purifikácia DNA-väzbovej domény ľudského forkhead transkripčného faktoru FOXO4<sub>82-207</sub> boli vyčlenené ako jeden z cieľov bakalárskej práce.

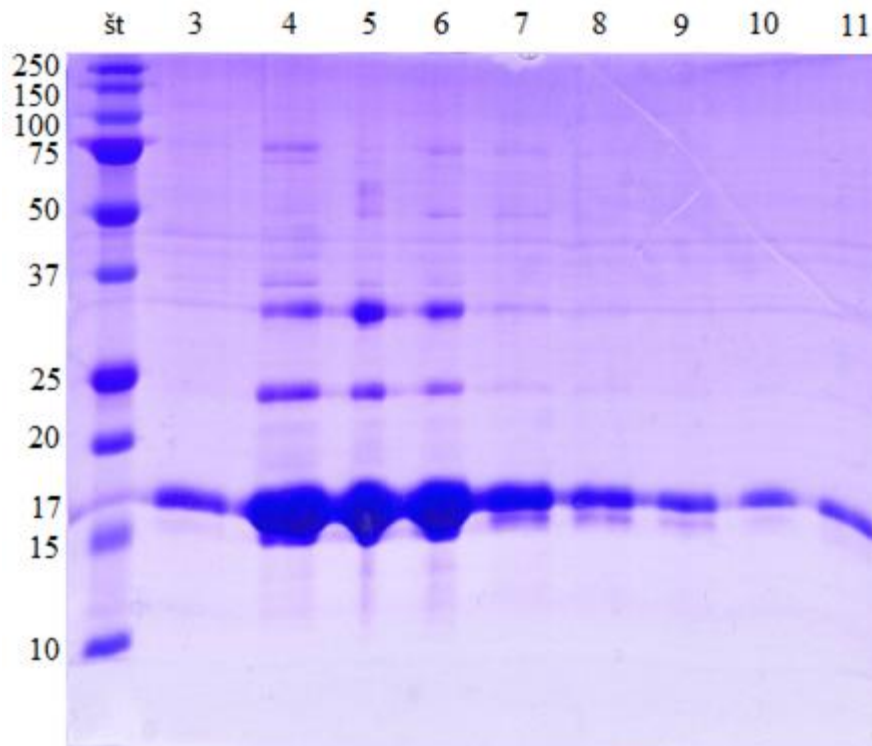
Proteín FOXO4<sub>82-207</sub> sa exprimoval podľa uvedeného postupu ako fúzny proteín s His-tagom na N-konci.

## 5.2 Purifikácia FOXO4<sub>82-207</sub>

Purifikácia proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> pozostáva z troch čiastkových procesov: niklová chelatačná chromatografia, kationovo-výmenná chromatografia a gélová permeačná chromatografia. Zámerom jednotlivých purifikačných krokov v danom poradí bolo získať z troch litrov bakteriálnych kultúr proteín FOXO4<sub>82-207</sub> s dostatočným výťažkom a čistotou, čo bolo sledované pomocou 15% SDS-PAGE.

### 5.2.1 Niklová chelatačná chromatografia

Kolóna niklovej chelatačnej chromatografie obsahovala 5 ml Chelating Sepharose Fast Flow. Elúcia proteínu prebiehala gravitačne, do mikroskúmaviek bolo zbieraných 12 frakcií po 1,5 ml. Z frakcií 3-11 boli odobrané vzorky na elektrolyzu SDS-PAGE a po analýze gélu (Obr. 5.1) boli zlúčené frakcie 3-8, s ktorými bola následne prevedená dialýza. Elektroforéza dokázala prítomnosť proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> s dostatočným výťažkom, čo ukázala relatívne veľká šírka jednotlivých pásov. Odpovedá aj relatívna molekulová hmotnosť – z grafu vyčítaná hodnota štandardu 17000 ku skutočnej molekulovej hmotnosti proteínu 16578. SDS-PAGE odhalila aj degradačné produkty purifikácie, ktoré pri elektroforéze putujú pomalšie a nachádzajú sa vo vrchnej časti gélu.

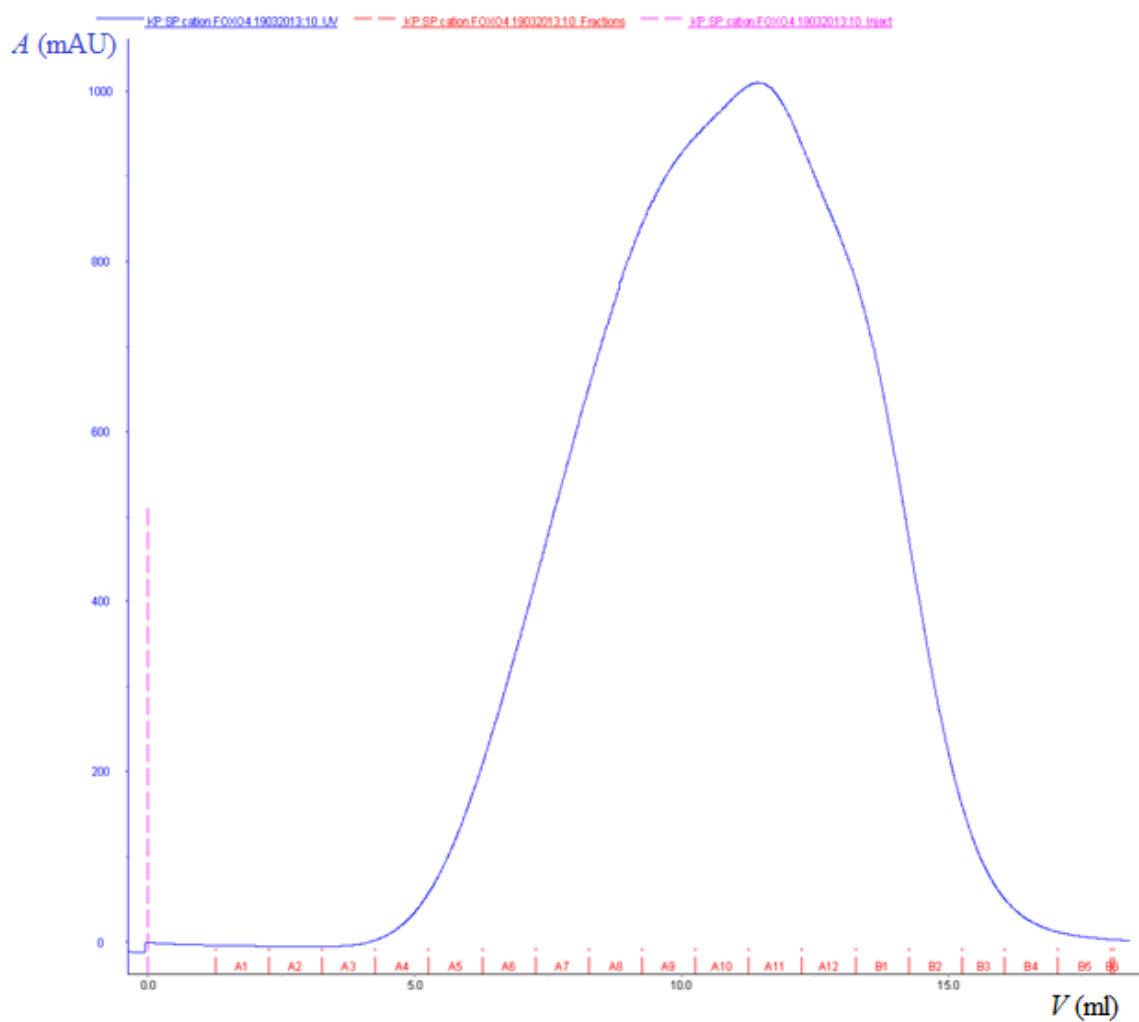


**OBR. 5.1:** Vizualizácia gélu po SDS elektroforéze. Do prvej jamky zľava bolo nanesených 10  $\mu$ l štandardu molekulových hmotností (št), ktoré sú vizualizované a popísané v obrázku, pričom hodnoty relatívnych molekulových hmotností sú v tisícoch. Do druhej až desiatej jamky boli nanesené frakcie 3-11 z niklovej chelatačnej chromatografie, v zložení 15  $\mu$ l vzorky proteínu z danej frakcie a 5  $\mu$ l farby.

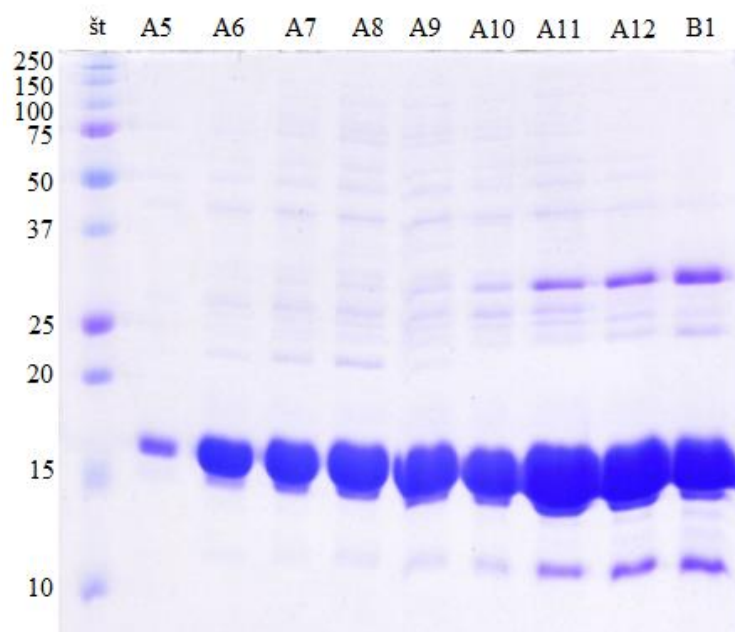
### 5.2.2 Kationovo-výmenná chromatografia

Na kationovo-výmennú chromatografiu sa používala kolóna naplnená SP Sefarózou s objemom 20 ml, maximálnym prietokom 1 ml/min. Objem každej frakcie bol 0,5 ml, do mikroskúmaviek bolo zbieraných 18 frakcií. Elektroforéza SDS-PAGE (Obr. 5.3) ukázala, že proteín FOXO4<sub>82-207</sub> sa nachádzal vo frakciách A6-B2. Čistota proteínu sa výrazne zlepšila.





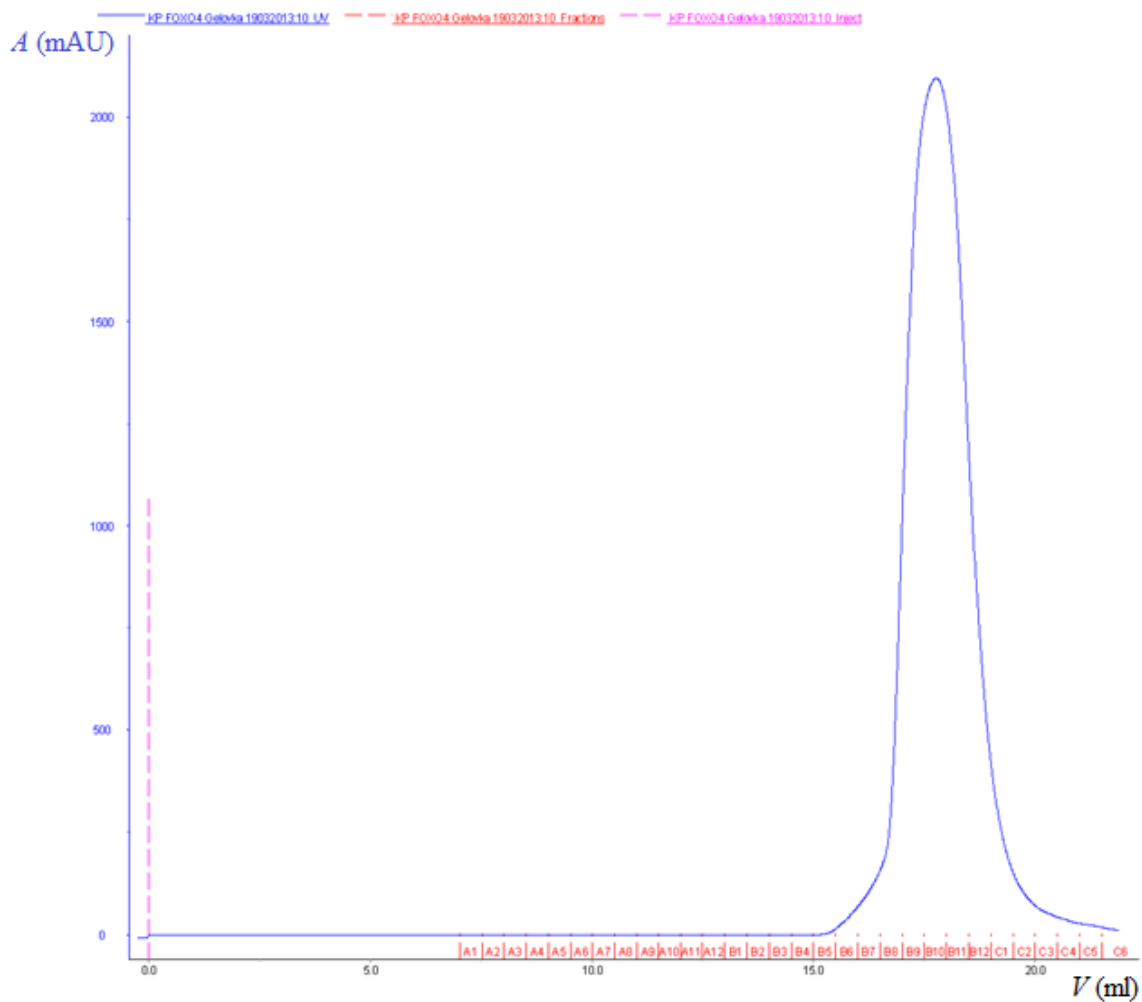
**OBR. 5.2: Chromatogram priebehu kationovo-výmennej chromatografie. Závislosť eluovaného objemu  $V$  (ml), na absorbancii  $A$  (mAU). Modrá línia znázorňuje závislosť absorbancie pri 280 nm na vyluovanom objeme. Červená farba určuje zbierané frakcie.**



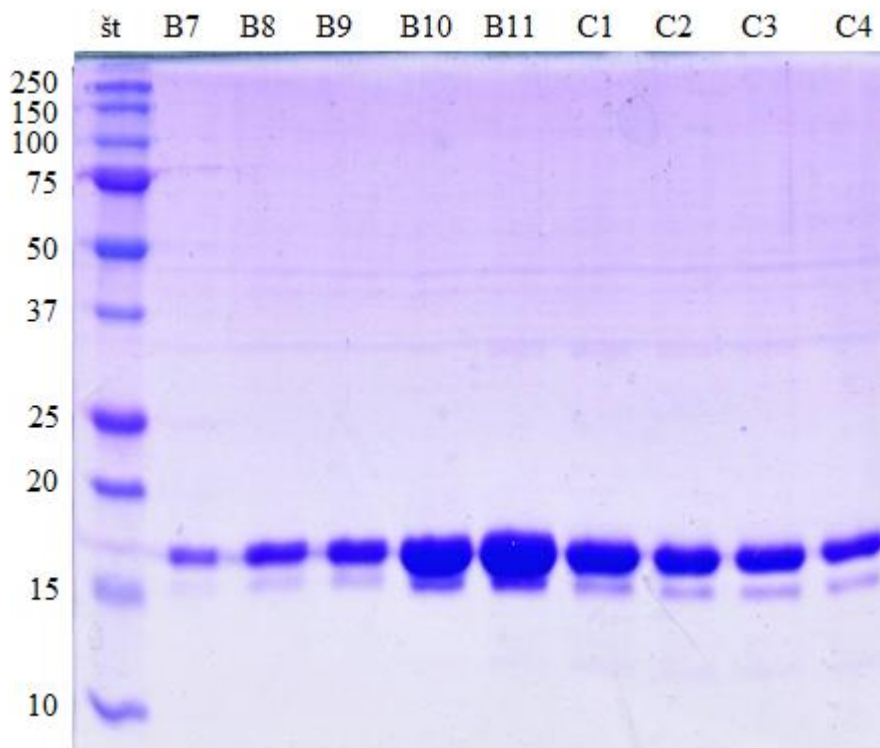
**OBR. 5.3:** Vizualizácia gélu po SDS elektroforéze. Do prvej jamky zľava bolo nanesených 10  $\mu$ l štandardu molekulových hmotností (št). Do druhej až desiatej jamky boli nanesené frakcie A5-B1 z kationovo-výmennej chromatografie, v zložení 15  $\mu$ l vzorky proteínu z danej frakcie a 5  $\mu$ l farby.

### 5.2.3 Gélová permeačná chromatografia

Na gélovú permeačnú chromatografiu sa používala kolóna Superdex 200 s objemom 24 ml a maximálnym prietokom 0,5 ml/min. Objem každej frakcie bol 0,5 ml, do mikroskúmaviek bolo zbieraných 30 frakcií. Elektroforéza SDS-PAGE (Obr. 5.5) ukázala, že proteín FOXO4<sub>82-207</sub> sa nachádzal vo frakciách B8-C4. Nečistoty už neboli ďalej prítomné, ale elektroforéza odhalila čiastočnú degradáciu proteínu v purifikačnom procese.



**OBR. 5.4:** Chromatogram priebehu gélovej permeačnej chromatografie. Závislosť eluovaného objemu  $V$  (ml), na absorbancii  $A$  (mAU). Modrá línia znázorňuje závislosť absorbancie pri 280 nm na vyluovanom objeme. Červená farba určuje zbierané frakcie.



**OBR. 5.5:** **Vizualizácia gélu po SDS elektroforéze.** Do prvej jamky zľava bolo nanesených 10  $\mu$ l štandardu molekulových hmotností (št). Do druhej až desiatej jamky boli nanesené frakcie B7, B8, B9, B10, B11, C1, C2, C3 a C4 v tomto poradí z gélovej permeačnej chromatografie, v zložení 15  $\mu$ l vzorky proteínu z danej frakcie a 5  $\mu$ l farby.

#### 5.2.4 Výtťažok purifikácie proteínu FOXO4<sub>82-207</sub>

Čistota purifikácie proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> sa vizualizovala pomocou SDS-elektroforézy (Obr. 5.5) po poslednom purifikačnom kroku.

Výtťažok sa stanovil spektrofotometricky podľa Lambert-Beerovho zákona zmeraním absorbancie:

$$A(\text{FOXO4}_{82-207}) = 5,8$$

Hmotnosť čistého proteínu FOXO4<sub>82-207</sub>:

$$m(\text{FOXO4}_{82-207}) = 3 \text{ mg}$$

Zo šiestich litrov LB média sa získali 3 mg FOXO4-DBD s dostatočnou čistotou pre ďalšie experimenty.

## 5.3 Vývoj a optimalizácia merania väzby FOXO4 na dsDNA pomocou ITC

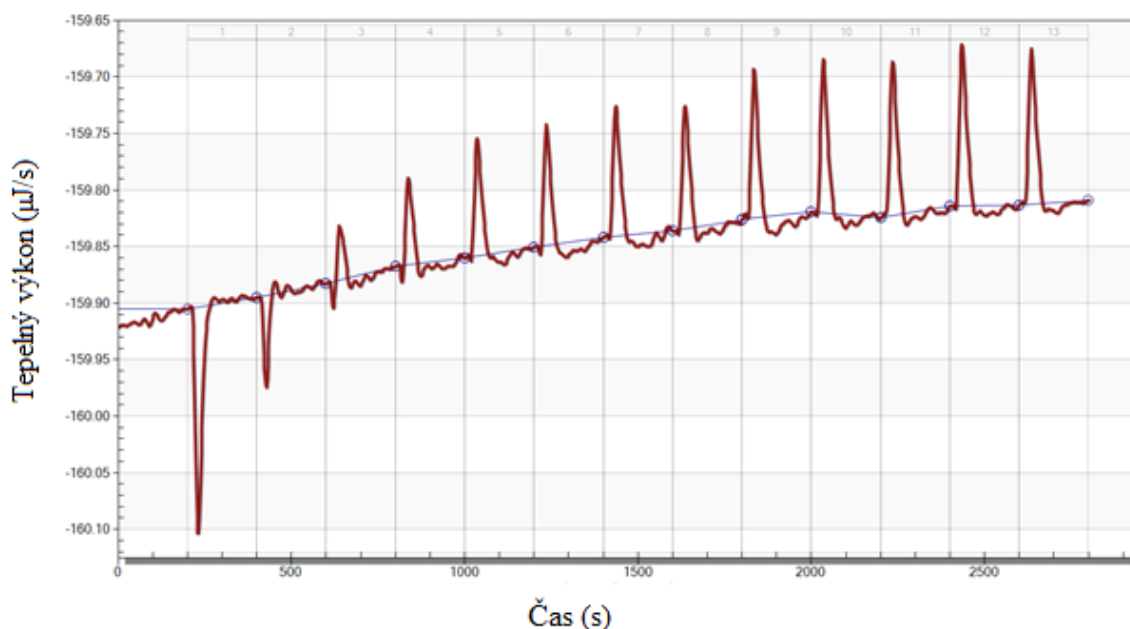
Hlavným cieľom bakalárskej práce bolo teoretické i praktické osvojenie metódy izotermálnej titračnej kalorimetrie. Používaný kalorimeter: NANO ITC - isothermal titration calorimeter od firmy TA Instruments, sa riadil softvérom Nano ITC Run Software v2.1.7, nazbierané hodnoty sa vyhodnocovali softvérom NanoAnalyze Software v2.3.6.

Optimalizácia metódy ITC pre meranie interakcií medzi FOXO4<sub>82-207</sub> a dsDNA prebiehala postupne volením rôznych koncentrácií DNA i proteínu, volením rôzneho objemu a počtu injektáží a času medzi jednotlivými injektážami. Taktiež sme zisťovali vplyv ionizačnej entalpie pufru, v ktorom boli proteín i DNA rozpustené, na ITC merania. Boli testované dva pufrы, ktoré sa výrazne líšia ionizačnou entalpiou: PBS ( $5,12 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) a Tris-HCl ( $49,75 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )<sup>[31]</sup>. Vhodný koncentračný rozsah pre proteín FOXO4<sub>82-207</sub> sa stanovil na 0,600 mM – 0,900 mM, pre dsDNA 0,060 mM – 0,150 mM. Najlepšie výsledky meraní sa dosiahli pri objeme injektáží stanovenom na 2,5  $\mu\text{l}$  s 20 nástrekmi a časovom odstupe 350 sekúnd.

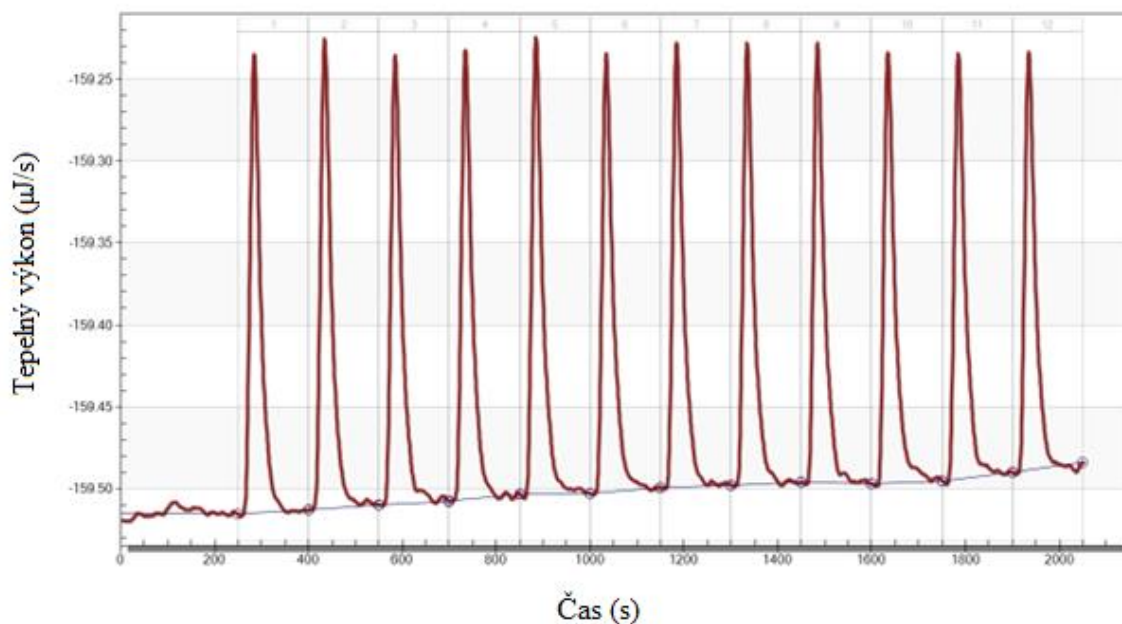
### 5.3.1 Kontrola prístroja

Funkčnosť, presnosť a čistota prístroja sa dokazovala pomocou titrácie deionizovanej vody. Do cely bolo vložených 250 – 300  $\mu\text{l}$  filtrovanej deionizovanej vody, do striekačky sa nabralo 50  $\mu\text{l}$ .

Problémy s uštalovaním baseline indikovali najmä zvyšky látok a častíc v cele z predchádzajúcich meraní, čo spôsobovalo nedostatočné preplachovanie. Keďže Nano izotermálna titračná kalorimetria je veľmi citlivá metóda, cela aj ihla sa preplachovali 4 M hydroxidom draselným a veľkým množstvom deionizovanej vody.



**OBR. 5.6:** Grafické zobrazenie izotermálnej titrácie deionizovanej vody pri probléme s nečistotami v cele. Na začiatku titrácie je zrejماً prítomnosť nečistôt, ktoré spôsobujú neznámy endotermný proces. V cele sa nachádzalo 250 µl a v striekačke 50 µl deionizovanej vody. Titrácia prebiehala pri teplote 25 °C, baseline sa uštalovala po dobu 120 minút. Prvá injektáž mala objem 2 µl, ďalšie injektáže mali objem 4 µl. Časový odstup medzi jednotlivými injektážami bol 200 sekúnd, baseline sa pred titráciou zaznamenávala 200 sekúnd. Modrá línia značí baseline a v momente injektáže vytvára krúžok.



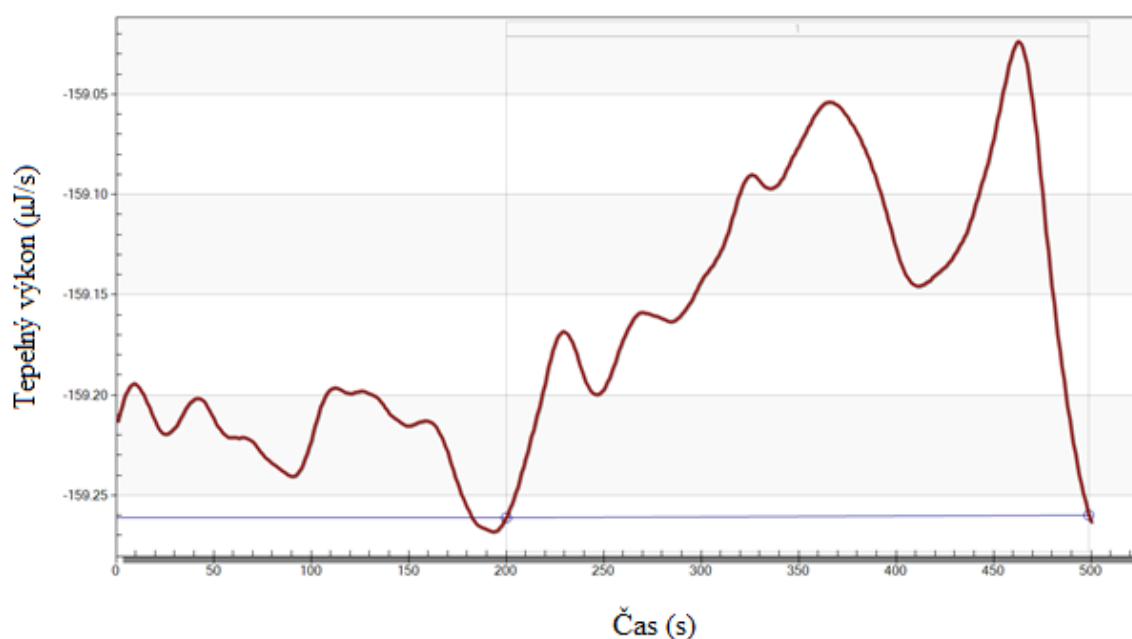
**OBR. 5.7:** Grafické zobrazenie izotermálnej titrácie deionizovanej vody s bezproblémovým priebehom. V cele sa nachádzalo 250  $\mu\text{l}$  a v striekačke 50  $\mu\text{l}$  deionizovanej vody. Titrácia prebiehala pri teplote 25  $^{\circ}\text{C}$ , baseline sa ustalovala po dobu 30 minút. Všetky injektáže majú objem 4  $\mu\text{l}$ . Časový odstup medzi jednotlivými injektážami bol 150 sekúnd, baseline sa pred titráciou zaznamenávala 250 sekúnd. Modrá línia značí baseline a v momente injektáže vytvára krúžok.

### 5.3.2 ITC meranie väzby FOXO4-DBD na DNA v pufre Tris-HCl s pH 7,5

Merania interakcie DNA-väzbovej domény proteínu FOXO4 a dsDNA na izotermálnom titračnom kalorimetri boli prevedené pri teplote 25  $^{\circ}\text{C}$ , na ktorú je prístroj kalibrovaný. Cela prístroja má objem 183  $\mu\text{l}$  a pri titrovaní musí mať v nej nachádzajúci sa reaktant 6 až 8 krát väčšiu koncentráciu, ako reaktant umiestnený v 50  $\mu\text{l}$  striekačke.

Teplota rozpadu dsDNA je 31 °C a je teda blízka teplote merania. Aby sa minimalizoval rozpad dvojvláknovej štruktúry na jednotlivé vlákna, pre umiestnenie DNA bola zvolená cela, kde sú makromolekuly nízko koncentrované a rozptýlené vo veľkom objeme. Počas merania bolo aktívne miešanie cely rýchlosťou 250 otáčok za minútu pomocou tzv. miešadielka umiestneného na konci ihly.

Pri samotných meraní interakcie proteínu FOXO4 s DNA nastalo niekoľko problémov. Najväznejší bol s uštal'ovaním baseline z neznámych príčin, čo je znázornené aj na obrázku 5.8. Takéto titrácie boli pre ďalšie použitie nevhodné.

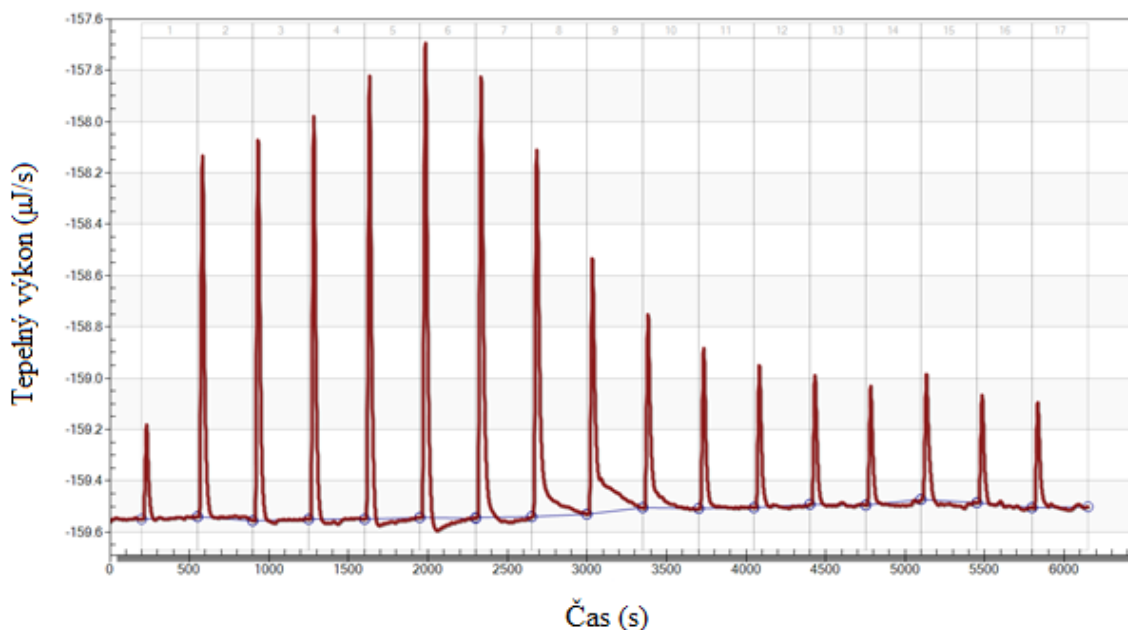


**OBR. 5.8:** Grafické zobrazenie izotermálnej titrácie roztoku dsDNA do roztoku proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> s neznámymi problémami v uštal'ovaní baseline. Základná línia pred prvým nástrekom je tak rozptýlená, že teplo uvoľnené z prvej injektáži úplne zaniká. V cele sa nachádzalo 250 µl roztoku dsDNA s koncentráciou 0,047 mM a v striekačke sa nachádzalo 50 µl roztoku proteínu FOXO4<sub>82-207</sub>s koncentráciou 0,376 mM. Injektáž mala objem 4 µl. Baseline sa pred titráciou zaznamenávala 200 sekúnd, časový odstup medzi prvou a druhou injektážou bol 300 sekúnd. Modrá línia značí baseline a v momente injektáže vytvára krúžok.



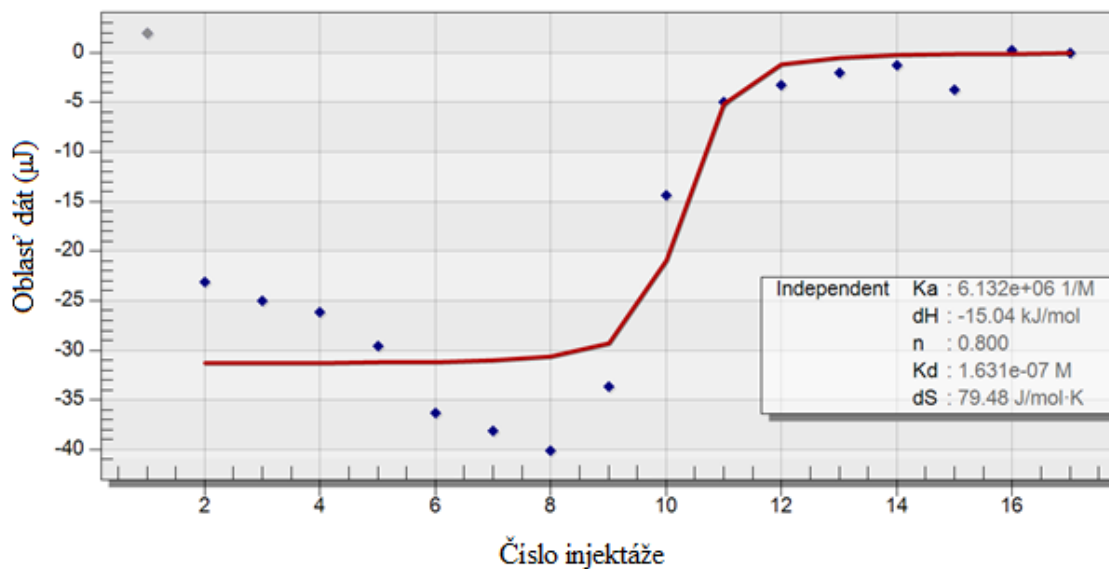
Po odstránení problémov s ustalovaním baseline bolo zmeraných niekoľko titrácií dsDNA do proteínu FOXO4<sub>82-207</sub>.

Na obrázkoch 5.9 a 5.11 sú znázornené výsledky dvoch vybraných titrácií. Objem prvého píku sa volil čo najmenší, pretože je ovplyvňovaný difúziou molekúl z ihly do cely, ktorá prebieha počas ustalovania baseline. FOXO4-DBD sa pri väzbe na DNA protonizuje a pretože pufr Tris-HCl má vysokú ionizačnú entalpiu, je možné na začiatku titrácie sledovať teplotné výkyvy, ktoré majú za následok skresľovanie výsledkov z merania ITC.



**OBR. 5.9:** Grafické zobrazenie izotermálnej titrácie roztoku dsDNA do roztoku proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> v prítomnosti Tris-HCl pufru. V cele sa nachádzalo 250 μl roztoku dsDNA s koncentráciou 0,142 mM a v striekačke sa nachádzalo 50 μl roztoku proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> s koncentráciou 0,688 mM. Prvá injektáž mala objem 1 μl, ďalšie injektáže mali objem 3 μl, spolu bolo zaznamenaných 17 píkov. Časový odstup medzi jednotlivými injektážami bol 350 sekúnd, baseline sa pred titráciou zaznamenávala 200 sekúnd. Modrá línia značí baseline a v momente injektáže vytvára krúžok.

Namerané píky sa spracovávali integrovaním so základňou tvorenou baseline a s integračnou oblasťou len samotného píku pomocou programu NanoAnalyze Software v2.3.6.



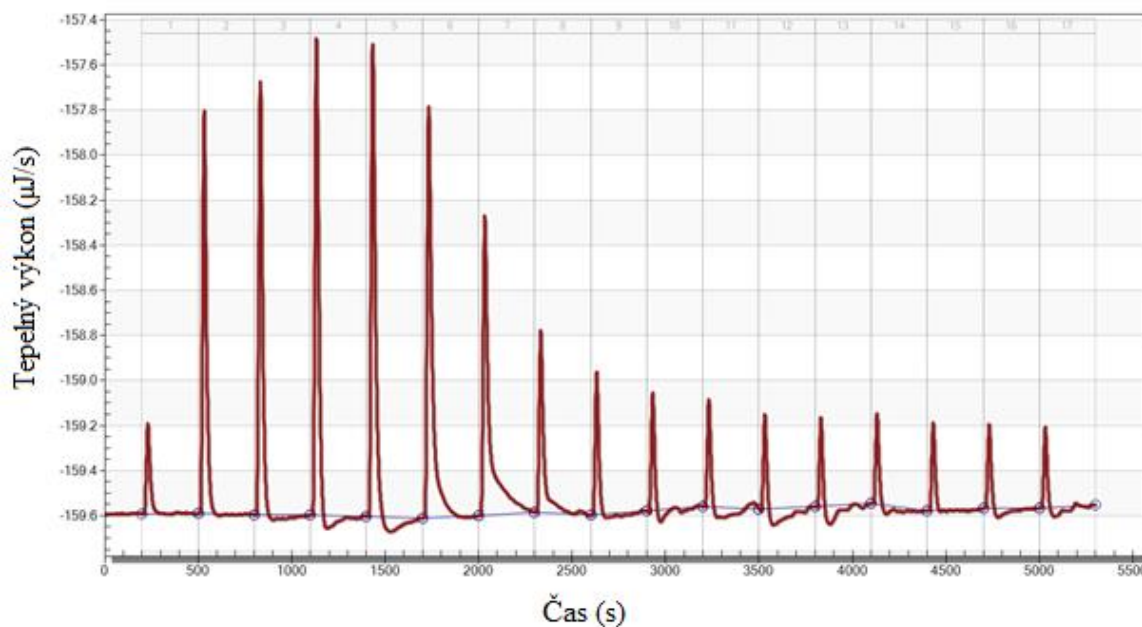
**OBR. 5.10: Grafické zobrazenie titračnej krivky.** Spracovanie píkov izotermálnej titračnej kalorimetrie pomocou integrácie, červená krivka predstavuje fit titračnej krivky.

Disociačná konštanta, výsledná entalpia a entropia interakcie proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> a dsDNA za prítomnosti Tris-HCl pufru:

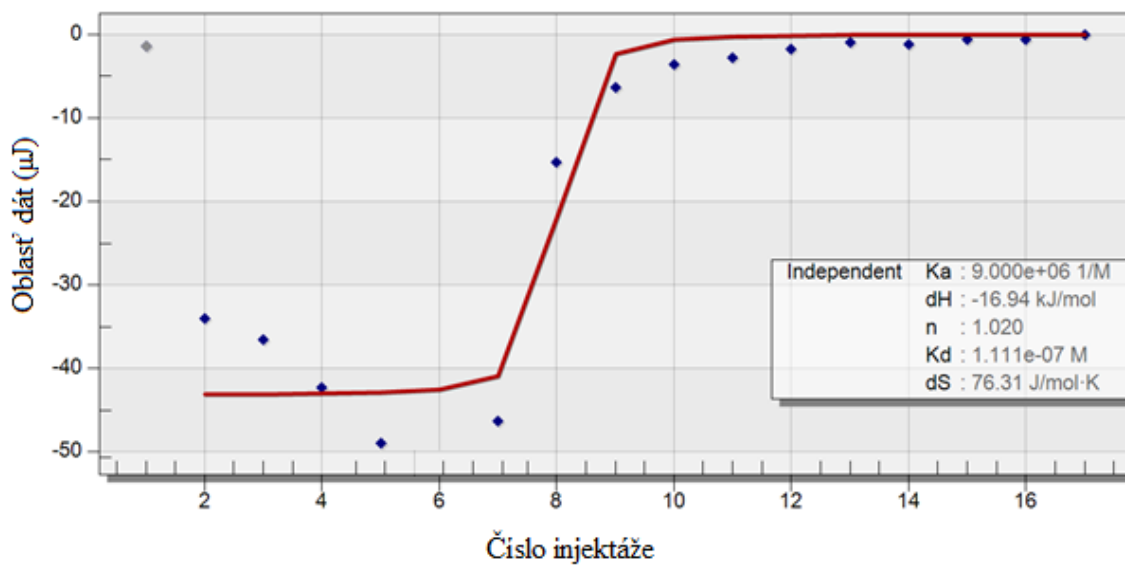
$$K_D = 1,63 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$\Delta H_{\text{obs}} = -15,04 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$\Delta S = 79,48 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$$



**OBR. 5.11:** Grafické zobrazenie izotermálnej titrácie roztoku dsDNA do roztoku proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> v prítomnosti Tris-HCl pufru. V cele sa nachádzalo 250  $\mu$ l roztoku dsDNA s koncentráciou 0,100 mM a v striekačke sa nachádzalo 50  $\mu$ l roztoku proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> s koncentráciou 0,840 mM. Prvá injektáž mala objem 1  $\mu$ l, ďalšie injektáže mali objem 3  $\mu$ l, spolu bolo zaznamenaných 17 pík. Časový odstup medzi jednotlivými injektážami bol 300 sekúnd, baseline sa pred titráciou zaznamenávala 200 sekúnd. Modrá línia značí baseline a v momente injektáže vytvára krúžok.



**OBR. 5.10: Grafické zobrazenie titračnej krivky.** Spracovanie píkov izotermálnej titračnej kalorimetrie pomocou integrácie, červená krivka predstavuje fit titračnej krivky.

Disociačná konštanta, výsledná entalpia a entropia interakcie proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> a dsDNA za prítomnosti Tris-HCl pufru:

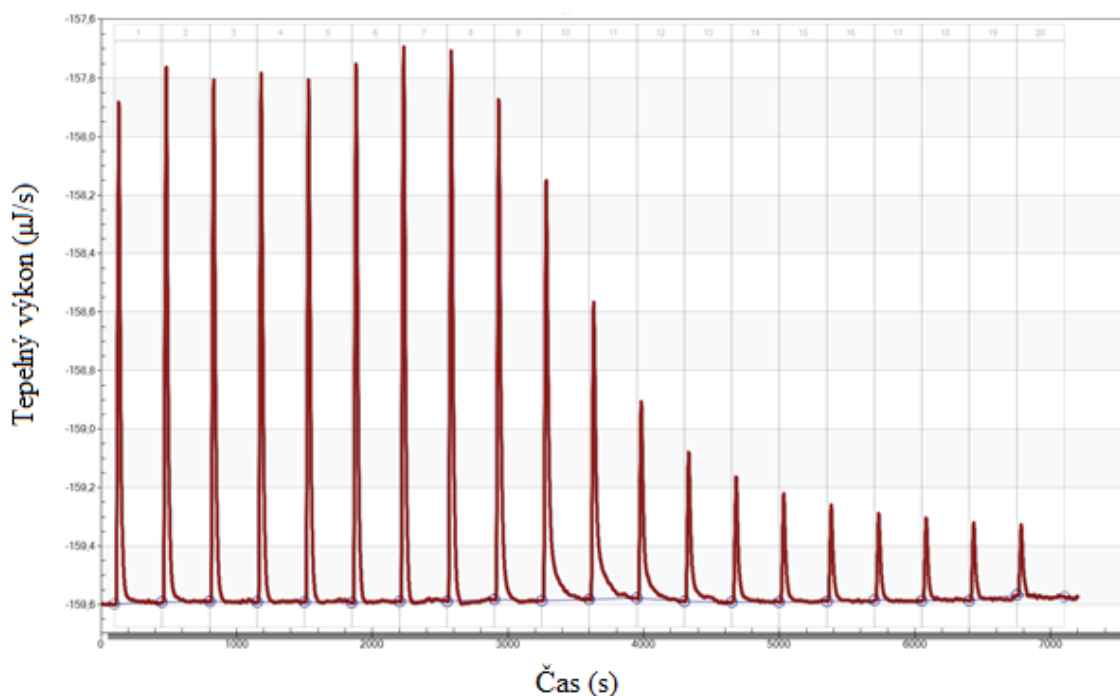
$$K_D = 1,11 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$\Delta H_{\text{obs}} = -16,94 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

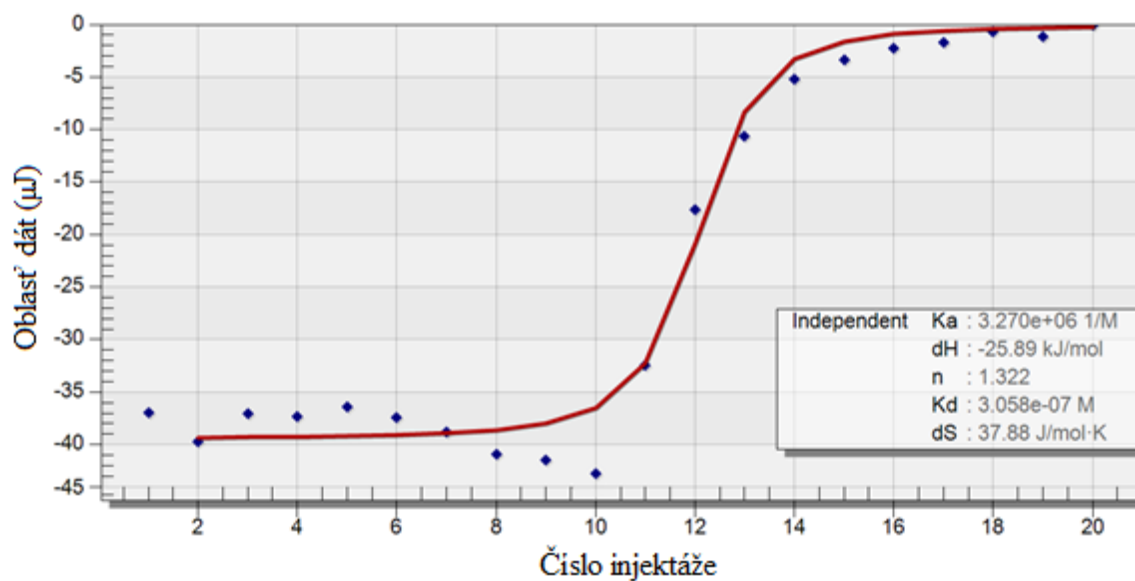
$$\Delta S = 76,31 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$$

### 5.3.3 ITC meranie väzby FOXO4-DBD na DNA v pufre PBS s pH 7,4

Pre odstránenie nežiadúceho vplyvu vysokej ionizačnej entalpie pufru Tris-HCl ( $\Delta H_i = 49,75 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) boli prevedené merania v pufre PBS ( $\Delta H_i = 5,12 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )<sup>[31]</sup>. Boli namerané štyri titrácie, uvedené na obrázkoch 5.11 – 5.17.



**OBR. 5.11:** Grafické zobrazenie izotermálnej titrácie roztoku dsDNA do roztoku proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> v prítomnosti PBS pufru. V cele sa nachádzalo 250  $\mu\text{l}$  roztoku dsDNA s koncentráciou 0,080 mM a v striekačke sa nachádzalo 50  $\mu\text{l}$  roztoku proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> s koncentráciou 0,610 mM. Prvá injektáž mala objem 1  $\mu\text{l}$ , ďalšie injektáže mali objem 2,5  $\mu\text{l}$ , spolu bolo zaznamenaných 20 pík. Časový odstup medzi jednotlivými injektážami bol 350 sekúnd, baseline sa pred titráciou zaznamenávala 200 sekúnd. Modrá línia značí baseline a v momente injektáže vytvára krúžok.



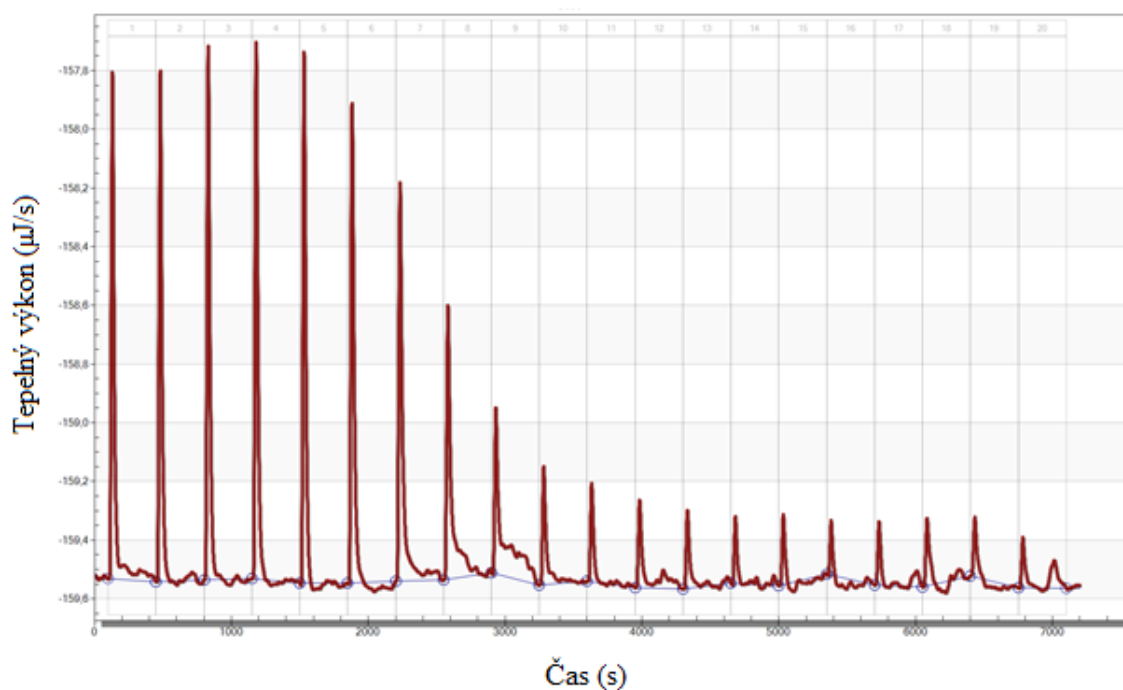
**OBR. 5.12: Grafické zobrazenie titračnej krivky.** Spracovanie píkov izotermálnej titračnej kalorimetrie pomocou integrácie, červená krivka predstavuje fit titračnej krivky.

Disociačná konštanta, výsledná entalpia a entropia interakcie proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> a dsDNA za prítomnosti PBS pufru:

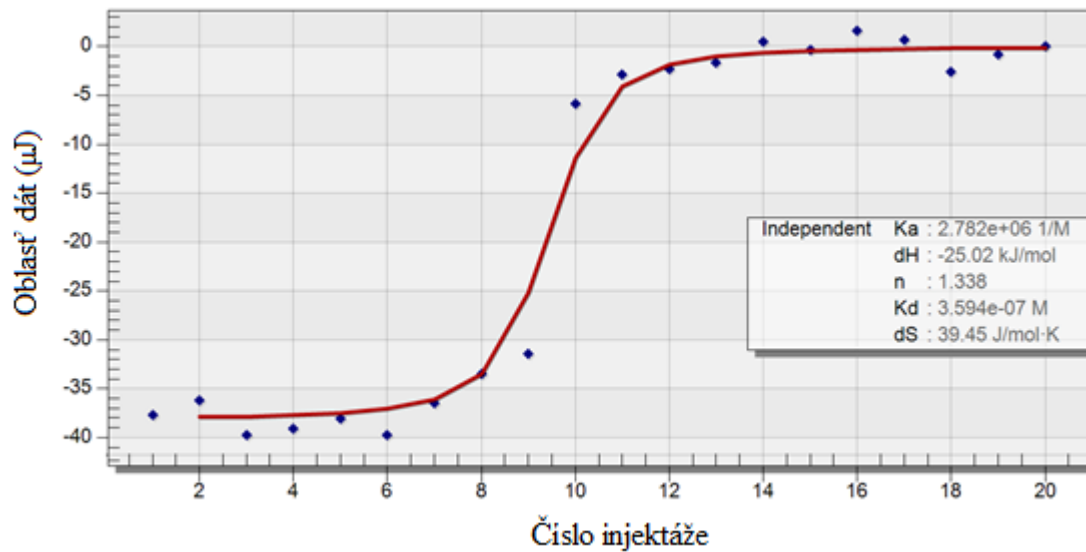
$$K_D = 3,06 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$\Delta H_{\text{obs}} = -25,89 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$\Delta S = 37,88 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$$



**OBR. 5.13: Grafické zobrazenie izotermálnej titrácie roztoku dsDNA do roztoku proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> v prítomnosti PBS pufru.** V cele sa nachádzalo 250  $\mu\text{l}$  roztoku dsDNA s koncentráciou 0,060 mM a v striekačke sa nachádzalo 50  $\mu\text{l}$  roztoku proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> s koncentráciou 0,610 mM. Prvá injektáž mala objem 1  $\mu\text{l}$ , ďalšie injektáže mali objem 2,5  $\mu\text{l}$ , spolu bolo zaznamenaných 20 pík. Časový odstup medzi jednotlivými injektážami bol 350 sekúnd, baseline sa pred titráciou zaznamenávala 200 sekúnd. Modrá línia značí baseline a v momente injektáže vytvára krúžok.



**OBR. 5.14: Grafické zobrazenie titračnej krivky.** Spracovanie píkov izotermálnej titračnej kalorimetrie pomocou integrácie, červená krivka predstavuje fit titračnej krivky.

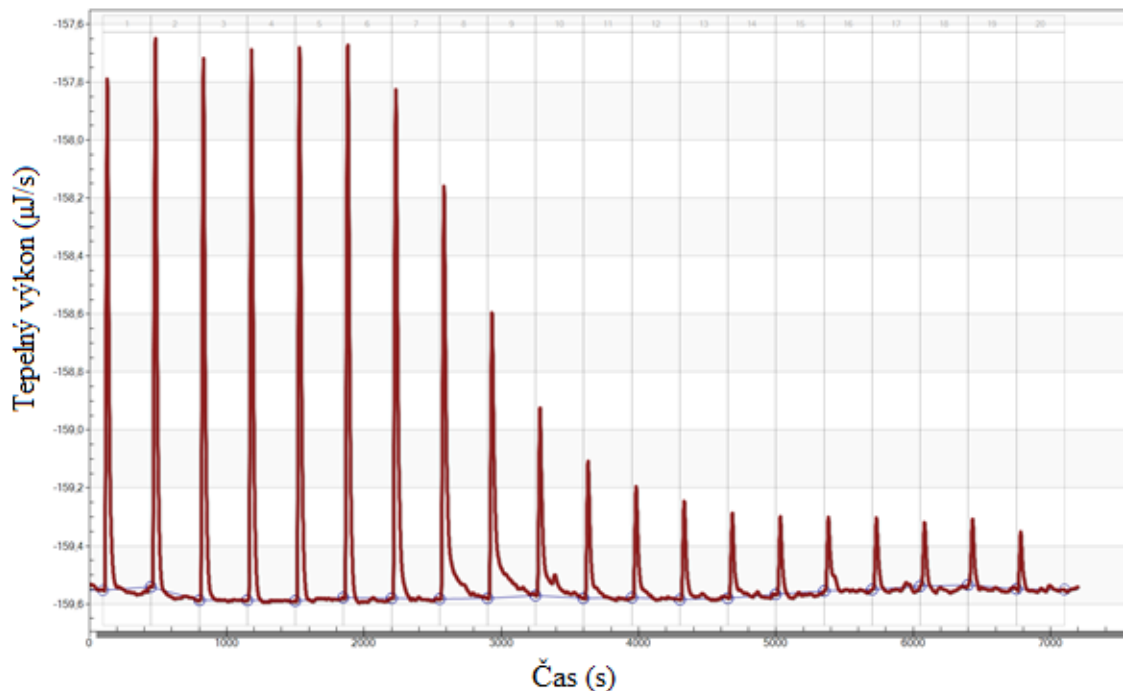
Disociačná konštanta, výsledná entalpia a entropia interakcie proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> a dsDNA za prítomnosti PBS pufru:

$$K_D = 3,60 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

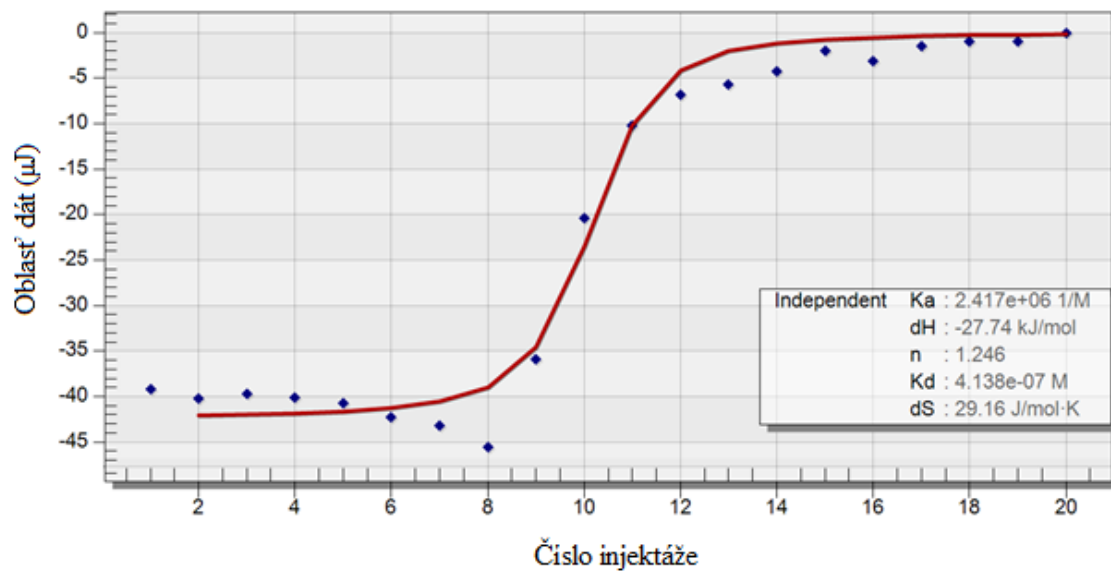
$$\Delta H_{\text{obs}} = -25,02 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$\Delta S = 39,45 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$$





**OBR. 5.15:** Grafické zobrazenie izotermálnej titrácie roztoku dsDNA do roztoku proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> v prítomnosti PBS pufru. V cele sa nachádzalo 250  $\mu\text{l}$  roztoku dsDNA s koncentráciou 0,070 mM a v striekačke sa nachádzalo 50  $\mu\text{l}$  roztoku proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> s koncentráciou 0,610 mM. Prvá injektáž mala objem 1  $\mu\text{l}$ , ďalšie injektáže mali objem 2,5  $\mu\text{l}$ , spolu bolo zaznamenaných 20 pík. Časový odstup medzi jednotlivými injektážami bol 350 sekúnd, baseline sa pred titráciou zaznamenávala 200 sekúnd. Modrá línia značí baseline a v momente injektáže vytvára krúžok.



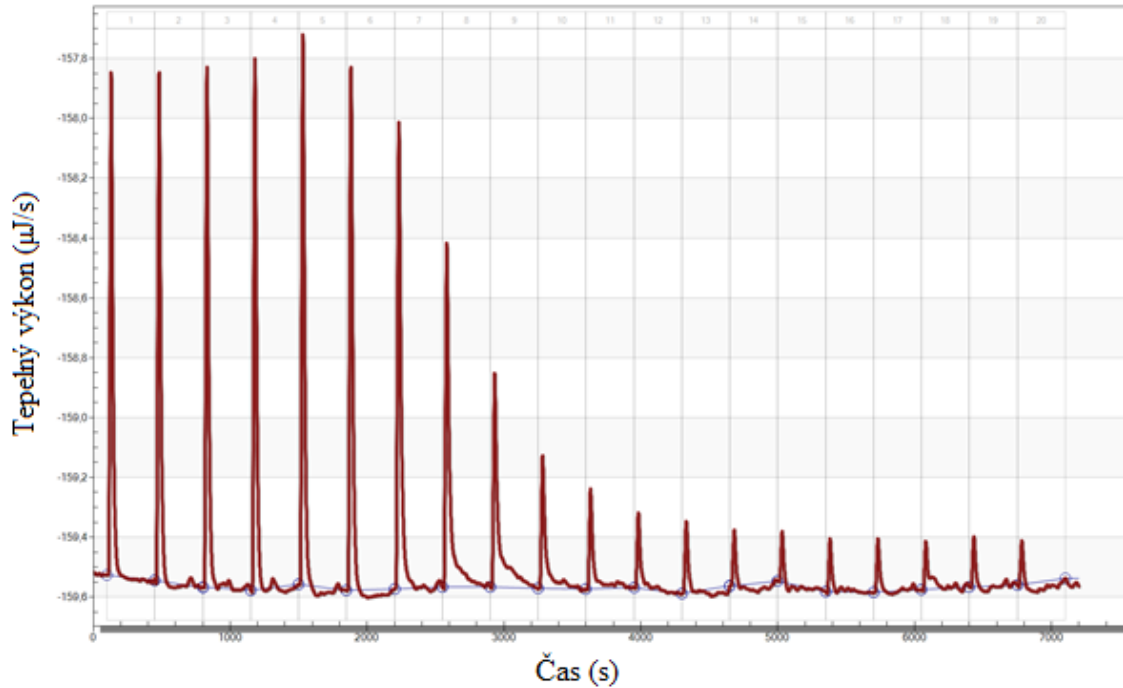
**OBR. 5.16: Grafické zobrazenie titračnej krivky.** Spracovanie pívkov izotermálnej titračnej kalorimetrie pomocou integrácie, červená krivka predstavuje fit titračnej krivky.

Disociačná konštanta, výsledná entalpia a entropia interakcie proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> a dsDNA za prítomnosti PBS pufru:

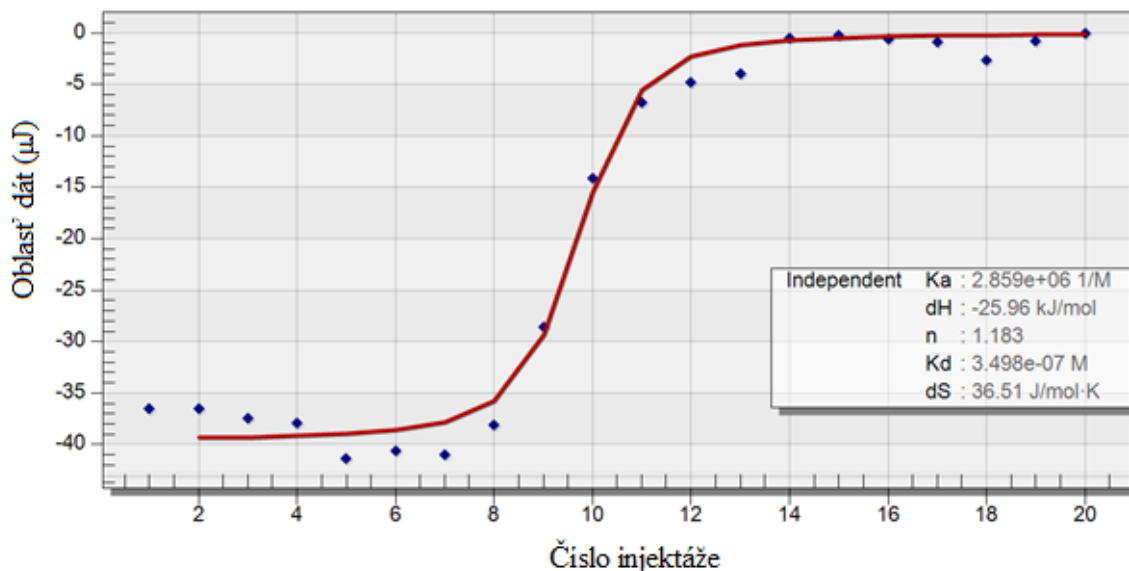
$$K_D = 4,14 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$\Delta H_{\text{obs}} = -27,74 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$\Delta S = 29,16 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$$



**OBR. 5.17:** Grafické zobrazenie izotermálnej titrácie roztoku dsDNA do roztoku proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> v prítomnosti PBS pufru. V cele sa nachádzalo 250 µl roztoku dsDNA s koncentráciou 0,070 mM a v striekačke sa nachádzalo 50 µl roztoku proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> s koncentráciou 0,610 mM. Prvá injektáž mala objem 1 µl, ďalšie injektáže mali objem 2,5 µl, spolu bolo zaznamenaných 20 pík. Časový odstup medzi jednotlivými injektážami bol 350 sekúnd, baseline sa pred titráciou zaznamenávala 200 sekúnd. Modrá línia značí baseline a v momente injektáže vytvára krúžok.



**OBR. 5.18: Grafické zobrazenie titračnej krivky.** Spracovanie píkov izotermálnej titračnej kalorimetrie pomocou integrácie, červená krivka predstavuje fit titračnej krivky.

Disociačná konštanta, výsledná entalpia a entropia interakcie proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> a dsDNA za prítomnosti PBS pufru:

$$K_D = 3,50 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$\Delta H_{\text{obs}} = -25,96 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$\Delta S = 36,51 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$$

Hodnoty disociačnej konštanty, výslednej entalpii a entropii interakcie proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> a dsDNA spolu s ich priemernými hodnotami za prítomnosti PBS pufru sú zhrnuté a uvedené v tabuľke 5.1.

Číslo titrácie	$K_D$ (mol·dm <sup>-3</sup> )	$\Delta H_{\text{obs}}$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (J/mol·K)
1	$3,06 \cdot 10^{-7}$	- 25,89	37,88
2	$3,60 \cdot 10^{-7}$	- 25,02	39,45
3	$4,14 \cdot 10^{-7}$	- 27,74	29,16
4	$3,50 \cdot 10^{-7}$	- 25,96	36,51
<b>Priemerné hodnoty</b>	<b><math>3,58 \cdot 10^{-7} \pm 0,78 \cdot 10^{-7}</math></b>	<b>- 26,15 ± 1,96</b>	<b>35,75 ± 7,41</b>

**TAB. 5.1: Hodnoty získané fitovaním.** Hodnoty disociačnej konštanty, výslednej entalpii a entropii interakcie proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> a dsDNA spolu s ich priemernými hodnotami za prítomnosti PBS pufru.

Priemerné hodnoty disociačnej konštanty, výslednej entalpii a entropii interakcie proteínu FOXO4<sub>82-207</sub> a dsDNA v prítomnosti PBS pufru:

$$K_D = 3,58 \cdot 10^{-7} \pm 0,78 \cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$$

$$\Delta H_{\text{obs}} = - 26,15 \pm 1,96 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$$

$$\Delta S = 35,75 \pm 7,41 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$$

## 6 DISKUSIA

Izotermálna titračná kalorimetria je metódou merajúcou energiu biochemických reakcií a molekulových interakcií pri konštantnej teplote.<sup>[3]</sup> Používa sa pri meraní väzbovej afinity, špeciálne na meranie rozmerov zmien termodynamických veličín, zmien entropie a entalpie. ITC umožňuje priamu analýzu ľubovoľne vysokých väzbových afínit, nano izotermálny titračný kalorimeter má schopnosť zachytiť zmenu tepla reakcie v rádoch nanoJoulov. Kalorimeter spracováva elektrický signál ako teplo potrebné na ohriatie, alebo ochladenie meranej cely s prebiehajúcou reakciou voči konštantnej teplote referentnej cely, pričom relatívne zmeny sa spracovávajú do grafov. Moment reakcie zaháji náhlu zmenu teploty meranej cely, čo sa v grafe vykreslí ako pík. Reaktant A nachádzajúci sa v striekačke sa postupne dostáva do cely, kde interaguje s reaktantom B, pričom pri endotermnej reakcii sa teplo zo systému spotrebováva a vznikajúci pík smeruje nadol, exotermná reakcia teplo uvoľňuje a vytvorený pík smeruje nahor.<sup>[2, 3]</sup>

Proteín FOXO4 patrí do podskupiny „O“ rodiny forkhead box transkripčných faktorov. Proteíny rodiny forkhead transkripčných faktorov majú zásadnú úlohu v bunkovom vývoje, proliferácii, diferenciácii, odolnosti voči stresu, apoptóze a spolupodieľajú sa na kontrole celkového metabolizmu buniek. DNA-väzbová doména proteínu FOXO4 so sekvenciou aminokyselín 82-207 rozpoznáva DNA najmä podľa báz vďaka chemickému odtlačku, kde  $\alpha$ -helix H3 proteínu interaguje s veľkým žliabkom v štruktúre DNA.<sup>[10]</sup>

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo optimalizovať metódu ITC pre štúdium proteín-DNA interakcií, konkrétne medzi proteínom DNA-väzbovou doménou proteínu FOXO4 a dsDNA so sekvenciou 5'- CTA TCA AAA CAA CGC -3'. Za týmto účelom sme exprimovali a purifikovali DNA-väzbovú doménu forkhead transkripčného faktoru FOXO4, čistotu purifikácie sme skontrolovali pomocou elektroforézy SDS-PAGE. Dvojvláknovú DNA sme pripravovali z oligonukleotidov IRE-1 a IRE-2 s danou sekvenciou.

Pri meraní interakcií na Nano Izotermálnom Titračnom Kalorimetri sme čelili niekoľkým problémom, najmä s ustáľovaním baseline. Problém sa vyriešil pri dostatočnom vyčistení všetkých častí prístroja.

Proteín FOXO4 pri väzbe na DNA sa na základe kryštálovej štruktúry komplexu FOXO4:DNA protonizuje na His152, pričom ionizácia proteínu je spôsobená povahou interakcie medzi FOXO4-DBD a dsDNA.<sup>[5]</sup> Titrácie, ktoré prebiehali v prítomnosti Tris-HCl pufru vykazovali redukciu nameraného tepla pravdepodobne v dôsledku tepelného efektu väzbovej interakcie, do ktorého sa pri protonizácii proteínu premieta aj ionizačná entalpia pufru, v ktorom sa uskutočňuje experiment. Zmenou pufru na PBS pufor s nižšou ionizačnou entalpiou sa redukcia nameraného tepla eliminovala, čo dokazuje, že voľba správneho pufru pre ITC merania je jeden z kľúčových faktorov úspešnosti tejto metódy.

Ďalšie údaje o interakcii medzi FOXO4 a dsDNA by sa získali skúšaním rôznych sekvencií a rôznej dĺžky makromolekuly DNA. Následne by bolo potrebné experimenty zopakovať a získať niekoľko ďalších súborov dát pre presnejšie vypočítanie termodynamických aspektov interakcie.

## 7 ZÁVER

- Exprimovala a purifikovala som DNA-väzbovú ľudského forkhead transkripčného faktoru FOXO4<sub>82-207</sub>. Čistotu a výťažok purifikácie som zisťovala pomocou metódy SDS-PAGE.
- Osvojila som si metódu izotermálnej titračnej kalorimetrie, teoreticky aj prakticky.
- Študovala som interakcie medzi dsDNA a proteínom FOXO4<sub>82-207</sub> pomocou metódy ITC, ktorú som optimalizovala na dosiahnutie čo najlepších výsledkov. Diskutovala som výsledky merania a dospela som k názoru, že metóda ITC je vhodná pre štúdium FOXO4-DBD-DNA interakcií.



## 8 ZOZNAM CITOVA NEJ LITERATÚRY

- 1 Liang Y.: Applications of isothermal titration calorimetry in protein science; *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 40/7 565-575 (2008)
- 2 Leavitt S., Freire E.: Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry; *Current Opinion in Structural Biology*, 11 560-566 (2001)
- 3 Freire E., Mayorga O. L., Straume M.: Isothermal Titration; *Analytical Chemistry*, 62/18 950-959 (1990)
- 4 Jürgens G., Weigel D.: Terminal versus segmental development in the *Drosophila* embryo: the role of the homeotic gene fork head; *Roux's archives of developmental biology*, 197 345-354 (1988)
- 5 Boura E., Rezaczkova L., Brynda J., Obsilova V., Obsil T.: Structure of the human FOXO4-DBD-DNA complex at 1.9 Å resolution reveals new details of FOXO binding to the DNA; *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66 1351-1357 (2010)
- 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 Carlsson P., Mahlapuu M.: Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism; *Developmental Biology*, 250 1-23 (2002)
- 9 Bender D. A., Mayes P. A., Botham K. M., Granner D. K., Keeley P. J., Murray R. K., Rand M. L., Rodwell V. W., Weil P. A.: *Harper's Illustrated Biochemistry*; *LANGE medical book*, 26<sup>th</sup> ed. (2003)

- 10 Obsil T., Obsilova V.: Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors; *Oncogene*, 27 2263–2275 (2008)
- 11 Burgering B. M. T.: A brief introduction to FOXology; *Oncogene*, 27 2258–2262 (2008)
- 12 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)
- 13 Calnan D. R., Brunet A.: The FoxO code; *Oncogene*, 27 2276–2288 (2008)
- 14 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)
- 15 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)
- 16 Rohs R., Jin X., West S. M., Joshi R., Honig B., Mann R. S.: Origins of specificity in protein-DNA recognition; *Annual Review of Biochemistry*, 79 233–269 (2010)
- 17 Koolman J., Roehm K. H.: Color Atlas of Biochemistry; *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart, 3<sup>rd</sup> ed. (2005)
- 18 Reddy Ch. K., Das A., Jayaram B.: Do water molecules mediate protein-DNA recognition?; *Journal of Molecular Biology*, 314 619–632 (2001)
- 19 Obsil T., Obsilova V.: Structural basis for DNA recognition by FOXO proteins; *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813 1946–1953 (2011)

- 20 Brent M. M., Anand R., Marmorstein R.: Structural basis for DNA recognition by FoxO1 and its regulation by posttranslational modification; *Structure*, 16 1407–1416 (2008)
- 21 Tsai K. L., Sun Y. J., Huang C. Y., Yang J. Y., Hung M. C., Hsiao C. D.: Crystal structure of the human FOXO3a-DBD/DNA complex suggests the effects of post-translational modification; *Nucleic Acids Research*, 35 6984–6994 (2007)
- 22 Oda M., Nakamura H.: Thermodynamic and kinetic analyses for understanding sequence-specific DNA recognition; *Genes to Cells*, 5 319-326 (2000)
- 23 Harlow E., Lane D.: *Antibodies: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor, Laboratory Press New York, 469 (1988)
- 24 Lakowicz J. R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York (1983)
- 25 Torreri P., Ceccarini M., Macioce P., Petrucci T. C.: Biomolecular interactions by surface plasmon resonance; *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 41 437–441 (2005)
- 26 Quinn C. F., Chilton M.: The Origin of the Independent Site Model Used in NanoAnalyze; *TA Instruments* (2010)
- 27 Kolektív autorov: Pokročilé praktikum z fyzikální chemie, Návody k úlohám; dostupné dňa 05.08.2013 na internetovej stránke:  
<http://lynette.natur.cuni.cz/stepanek/vyuka/praktikum.pdf>
- 28 Ryšlavá H., Liberda J., Doubnerová V., Weignerová L., Martínek V., Dračínská H., Man P., Novák P.: *Návody biochemických praktík I*; (2012)

- 29 Perozzo R., Folkers G., Scapozza L.: Thermodynamics of Protein–Ligand Interactions: History, Presence, and Future Aspects; *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 24/1&2 1-52 (2004)
- 30 Pierce M. M., Raman C. S., Nall B. T.: Isothermal Titration Calorimetry of Protein–Protein Interactions; *Academic Press*, 213-221 (1999)
- 31 Fukada H., Takahashi K.: Enthalpy and Heat Capacity Changes for the Proton Dissociation of Various Buffer Components in 0.1 M Potassium Chloride; *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 33 159-166 (1998)