

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra biochemie



**Studium interakce mezi DNA a transkripčními faktory pomocí
hmotnostní spektrometrie**

*Study of the interaction between DNA and transcription factors
using mass spectrometry*

Diplomová práce

Autor: Lukáš Slavata

Vedoucí práce: RNDr. Petr Man Ph.D.

Praha 2015

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli RNDr. Petru Manovi, Ph.D. za odborné vedení práce a trpělivost. Dále děkuji Mgr. Hynku Mrázkovi, Ph.D. za četné odborné konzultace a pomoc při práci. Kolektivu Laboratoře strukturní biologie a buněčné signalizace děkuji za velkorysou pomoc a vytvoření příjemného přátelského prostředí.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Petra Mana, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

Místo a datum:

Podpis:

Abstrakt:

Transkripční faktory hrají v rámci buňky i celého mnohobuněčného organismu zásadní regulační úlohu. Důležitým faktorem, je jejich schopnost interagovat s ostatními regulačními proteiny a DNA. Přesto, že rozsáhlá část této interakční sítě je již zmapována, detailních informací o struktuře a dynamice protein-proteinových a protein-DNA komplexů je dosud velmi málo.

V této práci jsme se zaměřili na možnosti studia konformačních změn daných tvorbou komplexu transkripčního faktoru s DNA pomocí strukturních metod hmotnostní spektrometrie: vodík/deuteriové výměny a chemického sítění. Jako modelový transkripční faktor jsme vybrali FOXO4, jehož DNA vazebná doména je strukturně dobře charakterizovaná jak ve volné formě, tak v komplexu s DNA (*In Czech*).

Klíčová slova:

hmotnostní spektrometrie, vodík/deuteriová výměna, chemické sítění, transkripční faktor, protein-DNA interakce, FOXO4

Abstract:

Transcription factors play crucial regulatory role within the cell and the entire multicellular organism. The important factor is its ability to interact with other regulatory proteins and DNA. Despite the fact that a large part of the interaction network is already documented, detailed information on the structure and dynamics of protein-protein and protein-DNA complexes is still scarce.

In this thesis we focused on the possibility of studying conformational changes given by the transcription factor-DNA complex formation using the methods of structural mass spectrometry: hydrogen/deuterium exchange and chemical crosslinking. As a model, we chose a transcription factor FOXO4 which DNA binding domain is structurally well characterized both in free form and in the complex with DNA.

Key Words:

mass spectrometry, hydrogen/deuterium exchange, chemical crosslinking, transcription factor, protein-DNA interaction, FOXO4

Seznam zkratk:

ACN	acetonitril
ATP	adenosintrifosfát
BAF	BRG1 asociované faktory (z angl. <i>BRG1-associated factors</i>)
bp	pár bází (z angl. <i>base pair</i>)
CBP	protein vázající protein vázající regulační element cyklického AMP (angl. <i>binding protein of cyclic AMP response element binding protein</i>)
CDK	cyklin závislá kinasa (z angl. <i>cyclin-dependent kinase</i>)
DBD	DNA vazebná doména (z angl. <i>DNA-binding domain</i>)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DSG	disukcinimidyl glutarát
DSS	disukcinimidyl suberátu
DTT	dithiotreitol
E2F	faktor vázající E2 promotor (z angl. <i>E2 promoter binding factor</i>)
cryoEM	kryoelektronová mikroskopie
EM	elektronová mikroskopie
ESI	elektrosprejová ionizace
FA	kyselina mravenčí (z angl. <i>formic acid</i>)
FOX	rodina transkripčních faktorů (z angl. <i>Forkhead box</i>)
FTICR	iontově-cyklotronová rezonance spojená s Fourierovou transformací (z angl. <i>Fourier-transform ion-cyclotron resonance</i>)
HDX	vodík/deuteriová výměna (z angl. <i>hydrogen/deuterium exchange</i>)
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin)ethansulfonová kyselina
HIF	hypoxií indukovaný faktor (z angl. <i>hypoxia-inducible factor</i>)
HPLC	vysokoúčinná kapalinná chromatografie (z angl. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
IPTG	izopropyl-β-D-galaktopyranosid
JNK	c-Jun N-koncová kinasa
LBD	ligand-vázající doména (z angl. <i>ligand-binding domain</i>)
LC-MS	kapalinná chromatografie spojená s hmotností spektrometrií (z angl. <i>liquid chromatography – mass spectrometry</i>)
LDS	dodecylsulfát litný (z angl. <i>lithium dodecyl sulfate</i>)
MLL	gen pro histonmethyltransferasu (z angl. <i>mixed-lineaged leukemia</i>)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (z angl. <i>mediator ribonucleic acid</i>)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. <i>mass spectrometry</i>)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NC	nitrocelulosa
NES	nukleární exportní sekvence
NLS	nukleární lokalizační sekvence
NMR	nukleární magnetická rezonance
OD	optická denzita
PI3K	fosfatidylinositol-3-kinasa
PIC	preiniciační komplex
PIR	reportér proteinových interakcí (z angl. <i>protein interaction reporter</i>)
PKB	protein kinasa B

PTEN	homolog fosfatasy a tensinu (z angl. <i>phosphatase and tensin homolog</i>)
Ral	Ras podobná GTPasa (z angl. <i>Ras-like GTPase</i>)
RE	regulační element
RISC	RNA indukovaný umlčovací komplex (z angl. <i>RNA-induced silencing complex</i>)
RIST	RNA indukovaný komplex transkripčního umlčování (z angl. <i>RNA-induced transcriptional silencing</i>)
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. <i>ribonucleic acid</i>)
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. <i>reactive oxygen species</i>)
RSC	komplex remodelující strukturu chromatinu (z angl. <i>remodeling the structure of chromatin</i>)
RSCB	výzkumné centrum pro strukturní bioinformatiku (z angl. <i>Research Collaboratory for Structural Bioinformatics</i>)
SDS	dodecylsulfát sodný (z angl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	elektroforetická separace v polyakrylamidovém gelu (z angl. <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
siRNA	malá interferující ribonukleová kyselina (z angl. <i>small interfering ribonucleic acid</i>)
SUMO	malý ubikvitinu příbuzný modifikační protein (z angl. <i>small ubiquitin-related modifier</i>)
SWI/SNF	komplex remodelují strukturu chromatinu (z angl. <i>switch/sucrose nonfermentable</i>)
TAD	transaktivační doména
TAF	faktory asociované s faktorem TBP (z angl. <i>TBP-associated factors</i>)
TBP	TATA úsek vázající protein (z angl. <i>TATA-binding protein</i>)
TF	transkripční faktor
UV	ultrafialové (z angl. <i>ultraviolet</i>)

Obsah

1	TEORETICKÁ ČÁST	- 1 -
1.1	REGULACE TRANSKRIPCE POMOCÍ TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ	- 1 -
1.1.1	<i>Význam chromatinu pro regulaci transkripce</i>	- 1 -
1.1.2	<i>Regulační elementy DNA.....</i>	- 4 -
1.2	MODULACE EXPRESE GENŮ TRANSKRIPČNÍMI FAKTORY	- 5 -
1.2.1	<i>Bazální transkripční komplex</i>	- 5 -
1.2.2	<i>Modulární stavba transkripčních faktorů.....</i>	- 7 -
1.2.3	<i>Pozitivní modulace exprese genů</i>	- 12 -
1.2.4	<i>Negativní modulace exprese genů</i>	- 14 -
1.3	REGULACE TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ	- 17 -
1.3.1	<i>Regulace syntézy.....</i>	- 17 -
1.3.2	<i>Regulace aktivity transkripčních faktorů.....</i>	- 18 -
1.4	TRANSKRIPČNÍ FAKTORY TŘÍDY FORKHEAD BOX /WINGED HELIX	- 19 -
1.4.1	<i>FOXO podrodina.....</i>	- 19 -
1.4.2	<i>FOXO4</i>	- 20 -
1.5	REGULACE FOXO4 POSTTRANSLAČNÍMI MODIFIKACEMI.....	- 20 -
1.5.1	<i>Fosforylace a buněčná lokalizace.....</i>	- 20 -
1.5.2	<i>Acetylace</i>	- 22 -
1.5.3	<i>Ubikvitinace</i>	- 23 -
1.6	ZAPOJENÍ FOXO4 DO BUNĚČNÉ SIGNALIZACE	- 24 -
1.6.1	<i>Regulace odpovědi na oxidativní stres</i>	- 24 -
1.6.2	<i>Regulace přechodu z G1 do S fáze buněčného cyklu</i>	- 26 -
1.6.3	<i>Regulace angiogeneze jako odpověď na hypoxii a hladinu nutrientů.....</i>	- 27 -
1.7	PROSTOROVÁ STRUKTURA FOXO4-DBD	- 28 -
1.8	METODY STUDIA STRUKTURY BIOLOGICKÝCH MAKROMOLEKUL.....	- 31 -
1.8.1	<i>Přístupy k řešení trojrozměrné struktury proteinů s vysokým rozlišením</i>	- 31 -
1.8.2	<i>Přístupy k řešení trojrozměrné struktury proteinů s nízkým rozlišením</i>	- 33 -
1.8.3	<i>Metody studia struktury proteinů založené na hmotnostní spektrometrii</i>	- 33 -
1.8.4	<i>Vodík/deuteriová výměna ve spojení s hmotnostně spektrometrickou analýzou.....</i>	- 34 -
1.8.5	<i>Chemické sítěni ve spojení s hmotnostně spektrometrickou analýzou</i>	- 38 -
2	CÍLE PRÁCE	- 42 -
3	MATERIÁL	- 43 -
3.1	PŘÍSTROJE A POMŮCKY	- 43 -
3.2	CHEMIKÁLIE.....	- 44 -

3.3	ENZYMY.....	- 46 -
3.4	BAKTERIÁLNÍ KMENY	- 46 -
3.5	VEKTORY A OLIGONUKLEOTIDY	- 46 -
3.6	ROZTOKY A MÉDIA	- 47 -
3.7	SOFTWARE.....	- 48 -
4	METODY.....	- 49 -
4.1	PŘÍPRAVA DNA VAZEBNÉ DOMÉNY TRANSKRIPČNÍHO FAKTORU FOXO4	- 49 -
4.1.1	<i>Transformace kompetentních buněk vektorem pET_15b_FOXO4-DBD.....</i>	- 49 -
4.1.2	<i>Test produkce proteinu FOXO4-DBD.....</i>	- 49 -
4.1.3	<i>Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....</i>	- 50 -
4.1.4	<i>Elektropřenos proteinů s následnou imunodetekcí.....</i>	- 50 -
4.1.5	<i>Velkoobjemová produkce proteinu FOXO4-DBD.....</i>	- 51 -
4.1.6	<i>Izolace proteinu z produkční kultury</i>	- 51 -
4.1.7	<i>Afinitní purifikace niklovou chelatační chromatografií.....</i>	- 52 -
4.1.8	<i>Odštěpení polyhistidinové kotvy</i>	- 52 -
4.1.9	<i>Gelová permeační chromatografie</i>	- 53 -
4.1.10	<i>Hmotnostně spektrometrická charakterizace produktů přípravy proteinu FOXO4-DBD.....</i>	- 53 -
4.2	VODÍK/DEUTERIOVÁ VÝMĚNA	- 54 -
4.2.1	<i>Příprava dvoušroubovice DNA</i>	- 54 -
4.2.2	<i>Příprava deuteriem značených vzorků</i>	- 54 -
4.2.3	<i>LC-MS/MS analýza produktů štěpení a jeho optimalizace.....</i>	- 54 -
4.2.4	<i>LC-MS analýza produktů vodík/deuteriové výměny.....</i>	- 56 -
4.3	CHEMICKÉ SÍTĚNÍ.....	- 57 -
4.3.1	<i>Příprava vzorků chemického sítění.....</i>	- 58 -
4.3.2	<i>Analýza produktů síťovací reakce elektroforézou v polyakrylamidovém gelu</i>	- 59 -
4.3.3	<i>Proteolytické štěpení produktů chemického sítění.....</i>	- 59 -
4.3.4	<i>LC-MS analýza produktů chemického sítění.....</i>	- 59 -
5	VÝSLEDKY	- 61 -
5.1	PRODUKCE PROTEINU	- 61 -
5.1.1	<i>Test produkce proteinu</i>	- 61 -
5.1.2	<i>Expese, izolace a afinitní purifikace.....</i>	- 62 -
5.1.3	<i>Odštěpení polyhistidinové kotvy a přečištění gelovou permeační chromatografií</i>	- 64 -
5.1.4	<i>Hmotnostně spektrometrická charakterizace produktů přípravy proteinu.....</i>	- 65 -
5.2	VODÍK/DEUTERIOVÁ VÝMĚNA	- 65 -
5.2.1	<i>Optimalizace proteolytického štěpení LC-MS/MS analýzou.....</i>	- 66 -
5.2.2	<i>LC-MS analýza produktů výměny.....</i>	- 66 -

5.3	CHEMICKÉ SÍTĚNÍ.....	- 70 -
5.3.1	<i>Elektroforetická separace chemického sítění proteinu</i>	<i>- 71 -</i>
5.3.2	<i>LC-MS analýza chemického sítění produktů proteolýzy</i>	<i>- 71 -</i>
	DISKUSE.....	- 75 -
6	DISKUZE	- 76 -
7	SHRNUTÍ.....	- 80 -
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	- 81 -
9	PŘÍLOHA.....	- 89 -

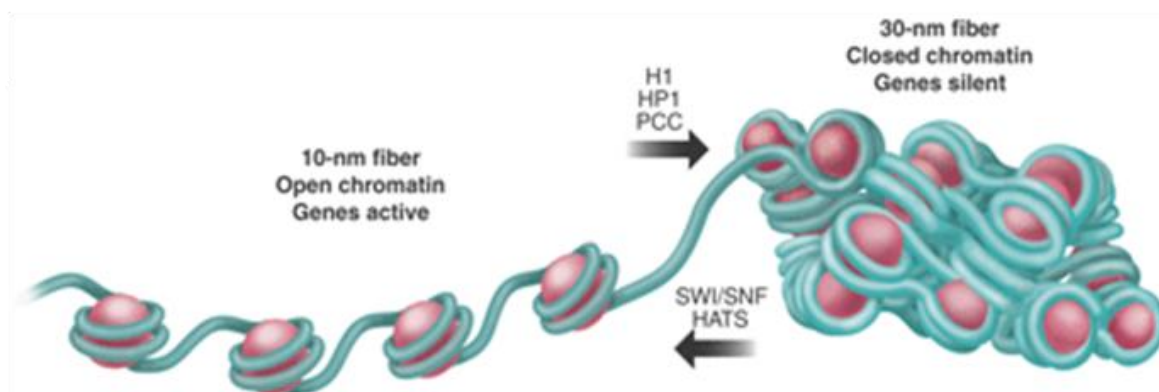
1 Teoretická část

1.1 Regulace transkripce pomocí transkripčních faktorů

Ústřední dogma molekulární biologie popisující tvorbu proteinů, funkčních komponent každé živé buňky, překladem ze sekvence ribonukleových kyselin (RNA, z angl. *ribonucleic acid*), která je přepisována ze sekvence deoxyribonukleových kyselin (DNA, z angl. *deoxyribonucleic acid*), udává základní směr toku informace od molekul ukládajících genetickou informaci k molekulám majícím svou specifickou funkci. Přihlédneme-li k faktu, že mnohobuněčné organismy jsou tvořeny buňkami mnohdy až stovek buněčných typů a každá z těchto buněk nese stejnou výchozí genetickou informaci, je zřejmé, že mechanismy regulující tento tok informací mají zásadní dopad na vývoj a správné fungování organismu. Ústřední roli regulátorů hrají transkripční faktory, jež jsou rozsáhlou skupinou proteinových molekul rozšířenou napříč všemi říšemi organismů, a jejichž struktura a funkce bude předmětem následujících kapitol.

1.1.1 Význam chromatinu pro regulaci transkripce

Sbalení téměř dvou metrů lidské DNA do prostoru buněčného jádra je umožněno vznikem struktury zvané chromatin. Jedná se o komplex proteinů, histonů, s DNA. Nejmenší opakující se jednotkou je nukleosom, který je tvořen devíti histony pěti typů (H2A, H2B, H3, H4 a H1) a asi 147 nukleotidovými páry obtáčeujícími dvakrát proteinové jádro. Mezi sousedními histony je minimálně 60 nukleotidových párů bez vazby na histon¹ (Obr. 1).



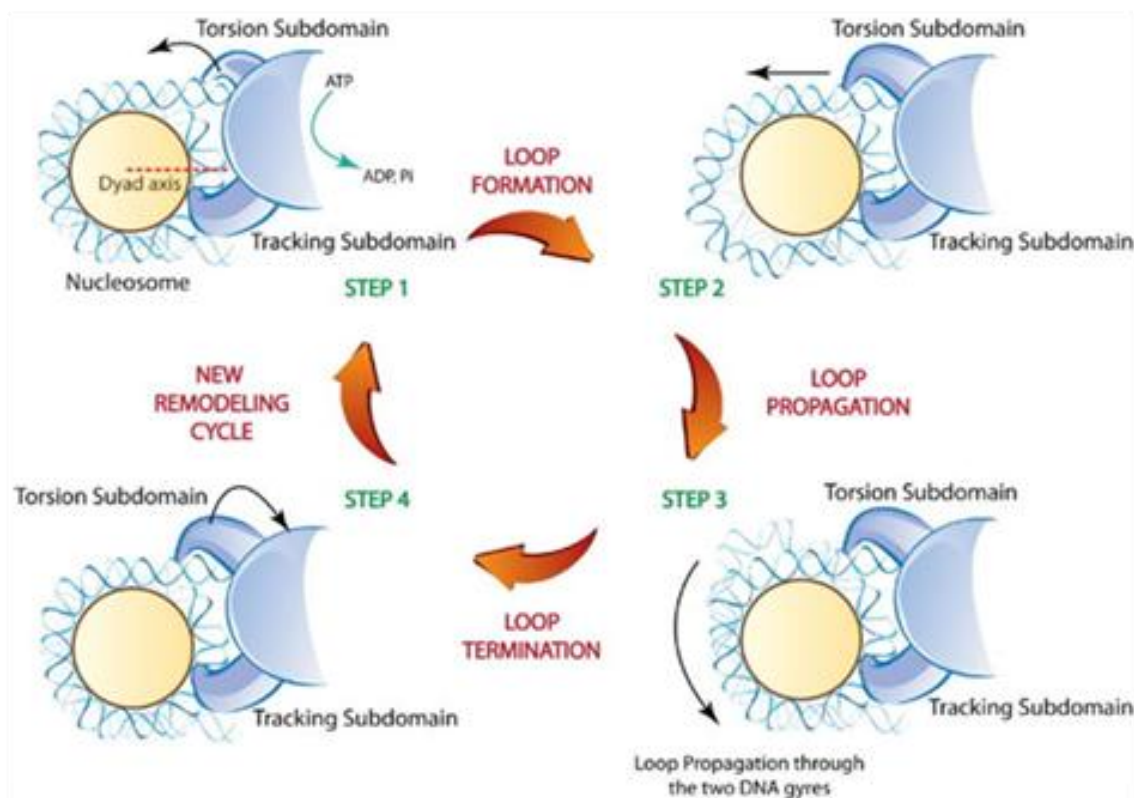
Obr. 1: Rozvolněná a těsná struktura chromatinu. Naznačeno ovinutí dvoušroubovice DNA kolem histonového komplexu – nukleosom. Obrázek doplněn enzymy podílejícími se na přeměně jedné struktury v druhou. Převzato z¹.

Vztahy mezi posttranslačními modifikacemi histonů, tím danou strukturou chromatinu a produkcí RNA, tedy transkripční aktivitou, byly objeveny již v šedesátých letech minulého století². Těsná struktura chromatinu (tzv. selenoidní struktura) nedovoluje přepis informace do RNA. Oproti tomu u rozvolněného chromatinu s přístupnými úseky mezi nukleosomy byla pozorována zvýšená míra přepisu³⁴. Jsou známy dva mechanismy podílející se na regulaci struktury chromatinu. První závisí na komplexech remodelujících chromatin (z angl. *chromatin remodeling complex*), druhý na aktivitě enzymů provádějících posttranslační modifikace histonů (acetylace, fosforylace, methylace, ubikvitinace, somoylace), stejně tak jako na aktivitě enzymů, které tyto modifikace odstraňují.

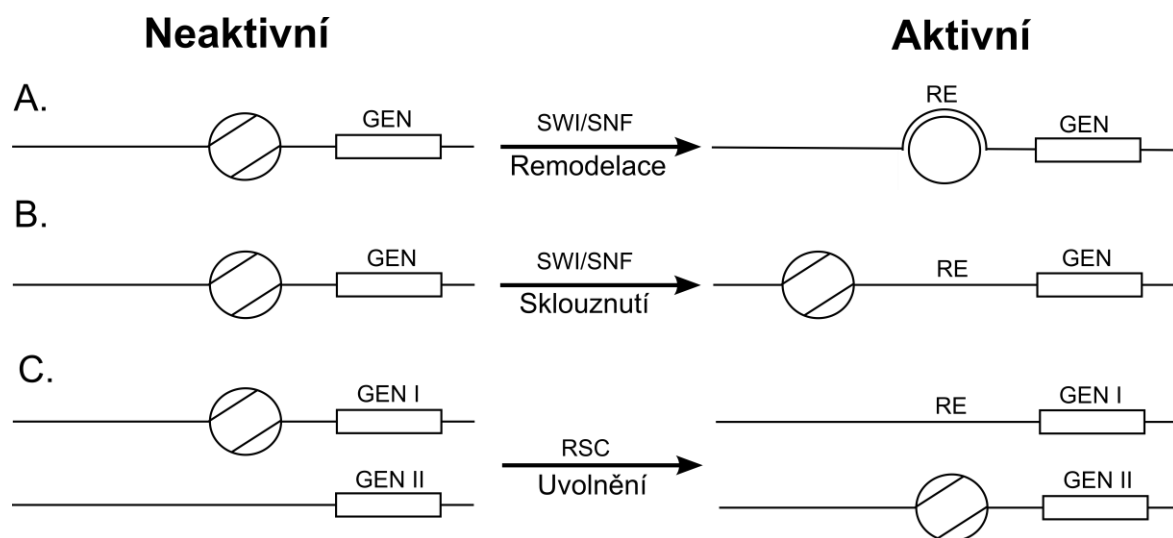
1.1.1.1 Remodelace chromatinu

Jedněmi z nejlépe prostudovaných komplexů remodelujících chromatin jsou SWI/SNF komplexy objevené původně v kvasinkách a později identifikované i u savčích buněk. Savčí homologa bývají také označována jako BAF proteiny (z angl. *BRG1-associated factors*)⁵. Tyto komplexy za spotřeby adenosintrifosfátu (ATP) ovlivňují dostupnost regulačních sekvencí (budou diskutovány v kap. 1.1.2), která je ovlivněna asociací s histony. Po asociaci remodelačního komplexu s nukleosomem dochází na DNA, která je původně navinuta na jádře nukleosomu, k tvorbě smyčky. Již v této fázi umožňuje přerušování kontaktů mezi DNA a histony interakci s dalšími proteiny indukujícími např. transkripci (viz Obr. 3a, str. 3). Vzniklá smyčka je dále komplexem posouvána podél nukleosomového jádra až do okamžiku, kdy dosáhne úseku mezi sousedními nukleosomy⁶. Tímto mechanismem dojde ke sklouznutí nukleosomu po DNA o délku smyčky (viz Obr. 2, str. 3, Obr. 3b, str. 3).

Další možností remodelace chromatinu popsanou na RSC (z angl. *Remodeling the Structure of Chromatin*, komplex příbuzný SWI/SNF) komplexu je úplná disociace histonů za vzniku volné DNA⁷ (viz Obr. 3c, str. 3). Komplexy remodelující chromatin jsou považovány za významné efekторы podílející se na regulaci transkripce. *In vitro* nevykazují žádnou sekvenční specifitu k úsekům DNA určeným pro přestavbu. Je zřejmé, že jejich cílení je modulované dalšími regulačními proteiny.



Obr. 2: Mechanismus remodelace chromatinu pomocí komplexu SWI/SNF. V první fázi dochází za spotřeby ATP k tvorbě smyčky, která dále aktivitou komplexu posunuta podél nukleosomového jádra. Celý mechanismus se opakuje až do okamžiku kdy smyčka DNA dosáhne úseku mezi sousedními nukleosomy. Převzato z¹⁴¹.



Obr. 3: Ilustrace možných mechanismů alterace struktury chromatinu. Komplex SWI/SNF může indukovat remodelaci chromatinu (A) nebo sklouznutí nukleosomu po vlákně DNA, čímž odhalí regulační element (RE). Příbuzný komplex RSC zajišťuje odhalení RE uvolněním nukleosomu, který je přenesen na jiný úsek DNA.

1.1.1.2 Modifikace histonů

Molekuly histonů hrají zásadní roli v regulaci struktury chromatinu. Ukázalo se, že histony jsou substrátem mnoha modifikačních enzymů, které jsou zároveň spojovány s procesy regulujícími expresi. Histony, acetylované na lysinových zbytcích, se častěji nacházejí v překládaných oblastech². Acetylace histonů snižuje celkový kladný náboj bazických molekul histonů, což vede ke snížení afinity k záporně nabitě deoxyribosafosfátové páteři DNA⁸. Genová exprese může být indukována faktory s histonacetyltransferasovou aktivitou a inhibována histondeacetylasy. Stejně jako acetylace lysinových zbytků i fosforylace určitých serinových zbytků vede k tvorbě rozvolněného chromatinu⁹. Methylace lysinových zbytků může navodit jak rozvolnění, tak vznik těsné selenoidní struktury¹⁰. Methylace narozdíl od acetylace nezpůsobuje změnu náboje. Pravděpodobným mechanismem se zdá být vznik interakčního místa v důsledku připojení methylové skupiny¹¹.

K indukci remodelace chromatinu v četných případech nestačí jediná modifikace, ale je vyžadována jejich určitá kombinace. Různé vzory postranslačních modifikací ve spojení s jejich funkcí vzhledem ke struktuře chromatinu jsou souhrnně označovány jako histonový kód (z angl. *histone code*)¹².

Modifikované histony mohou také rekrutovat komplexy remodelující chromatin, čímž dochází ke spojení dvou doposud separátně diskutovaných mechanismů v jeden funkční celek¹³. Obecně lze říci, že mechanismem účinku jednotlivých modifikací histonů je ovlivnění mezihistonových interakcí nebo interakcí mezi histony a dalšími proteiny, kterými jsou nejčastěji komplexy remodelující strukturu chromatinu.

1.1.2 Regulační elementy DNA

Objevu transkripčních faktorů předcházely studie poukazující na krátké úseky DNA vyskytující se v blízkosti kódujících oblastí genů. Geny s podobným expresním profilem vykazovaly přítomnost stejných sekvencí, regulačních elementů (RE)¹⁴. Takové RE se buď vyskytují v blízkosti většiny genů a jsou pravděpodobně zodpovědné za obecnou indukci transkripce (např. *TATA box*)¹⁵ nebo je nalezneme jen u genů, jejichž exprese závisí na konkrétním stimulu (např. element teplotního šoku, z angl. *heat shock element*)¹⁴. Tkáňově specifická exprese genu zahrnuje interakci s faktory, jež jsou produkovány, či jsou

v aktivní formě, pouze v dané tkáni. Mechanismem funkce RE se zdá být interakce s partnerem rozeznávajícím příslušný stimul. Tento mechanismus funkce RE závislý na vazbě buněčných faktorů je společný všem RE a tyto faktory jsou nazývány transkripčními faktory (TF).

Většina interakcí RE s transkripčními faktory vyústí v indukci transkripce. Existují však i regulační sekvence spojené s negativní modulací nazývané tlumiče (z angl. *silencers*). Míra výsledné transkripce je dána sumou pozitivních a negativních modulací¹⁶.

Regulační elementy jsou významným článkem regulace exprese proteinů. Regulaci transkripce ovlivňují skrze proteiny, které je rozpoznávají a mají tak spíše schopnost udávat kvalitu regulace, než její kvantitu. Je pravda, že zmnožení RE má vliv na výslednou míru regulace, ale i zde se jedná spíše o prvek amplifikující signál zprostředkovaný množstvím dostupných aktivních transkripčních faktorů.

1.2 Modulace exprese genů transkripčními faktory

RE elementy účinkují skrze vazbu s transkripčními faktory. Transkripční faktory mohou být aktivní konstitutivně, mohou se vyskytovat v neaktivní formě a do aktivní přejít až po indukci konkrétním stimulem. Výskyt RE ve skupinách předurčuje obecný princip jejich vzájemné kooperace nebo lépe řečeno vzájemné kooperace transkripčních faktorů, které je vážou. Výsledná míra transkripce závisí na poměru pozitivně a negativně působících faktorů¹⁴.

1.2.1 Bazální transkripční komplex

Pro transkripci je zásadní tvorba stabilního preiniciačního komplexu (PIC, z angl. *preinitiation complex*) skládajícího se z RNA polymerasy a nejméně šesti dalších transkripčních faktorů. Přestože v živé říši existují minimálně čtyři RNA polymerasy, v dalším textu bude uvažována jen transkripce RNA polymerasou II, která je zodpovědná za expresi všech genů kódujících proteiny. RNA polymerasa II je komplex 10 až 14 proteinů. Jednotlivé podjednotky RNA polymerasy II vykazují vysokou míru homologie jak v rámci eukaryot, tak mezi eukaryoty a bakteriemi¹⁷. Důležitou a vysoce konzervovanou je oblast C-koncové domény největší podjednotky komplexu RNA polymerasy II, kde se vyskytují mnohačetné tandemové repetice heptapeptidového motivu

YSPTSPS^{18,19}. Fosforylace tohoto repetitivního úseku vede k aktivaci RNA polymerasy II a zahajuje transkripci²⁰.

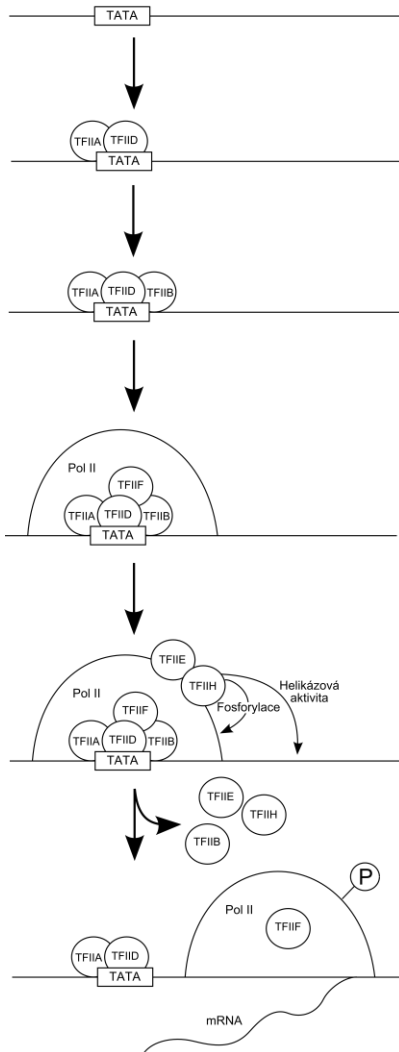
Tvorba preiniciačního komplexu začíná vazbou transkripčního faktoru TFIID do oblasti regulačního elementu TATA box nacházejícího se přibližně 30 párů bází před počátkem transkripce. Tato vazba je podpořena interakcí TFIID s TFIIA, který brání navázání inhibitorů TFIID. Svoji vazbou na TATA box TFIID mimikuje nukleosomové jádro, čímž indukuje ohyb v této oblasti. Na TATA box navázaný TFIID interaguje s TFIIB, který zprostředkovává interakci s hypofosforylovanou RNA polymerasou II v komplexu s TFIIF. Vazbu RNA polymerasy II do promotorové oblasti následují faktory TFIIE a TFIIH. TFIIH disponuje DNA helikasovou aktivitou vedoucí k disociaci řetězců DNA dvoušroubovice a kinasovou aktivitou fosforylující C-koncovou doménu RNA polymerasy II v oblastech tandemových heptapeptidů. Tímto dojde ke vzniku tzv. otevřeného iniciačního komplexu. Poté dochází k disociaci faktorů TFIIE, TFIIH a uvolnění komplexu RNA polymerasa II/TFIIF, který započne transkripci (viz Obr. 4, str. 7). Alternativou k této postupné tvorbě PIC je cesta holoenzymu RNA polymerasy II. Podmínkou alternativní cesty je tvorba komplexu RNA polymerasy II/TFIIF/TFIIB/TFIIE/TFIIH (Pol II holoenzym) v jaderné plazmě, který následně interaguje s komplexem TFIID/DNA²¹ (viz Obr. 4, str. 7). Tvorbu PIC, tak jak byla popsána výše, podporuje a značně jí napomáhá rozsáhlý multienzymový komplex nazvaný mediátor. Jednou z funkcí mediátoru je tvorba „lešení“ v promotorové oblasti sloužícího jako základna pro transkripční faktory při počínající tvorbě PIC²².

TFIID, faktor účastnící se prvního kroku tvorby PIC, je multiproteinový komplex tvořený proteinem TBP (z angl. *TATA-binding protein*) a řadou dalších proteinů interagujících s TBP (tzv. TAF, z angl. TBP-associated factors). TBP je komponenta odpovědná za vazbu TATA box elementu a jeho ohyb. TAF obecně zajišťují citlivost na aktivační signály (kap. 1.2.3.1).

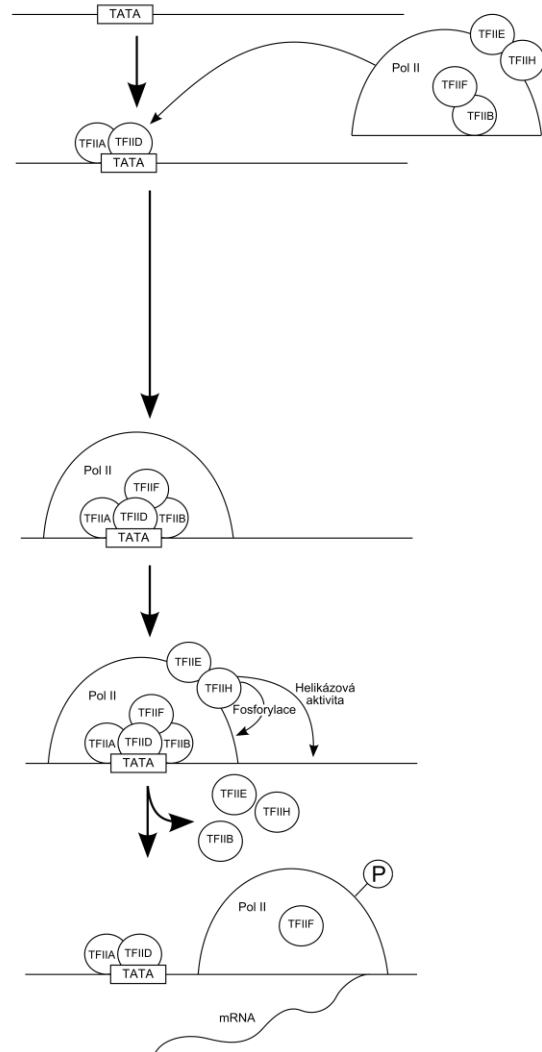
U TAF_{II}250 byla identifikována histon acetyltransferasová aktivita umožňující modulaci chromatinové struktury (kap. 1.1.1)²³. U genů, v jejichž promotorové oblasti je TATA box nahrazen jiným iniciačním elementem, je vazba TBP k DNA zprostředkována adaptorovými faktory. Zbytek PIC zůstává stejný²⁴. Některé TAF specificky rozpoznávají DNA sekvence za TATA box oblastí, čímž lze vysvětlit preferenční obsazování určitých promotorových jader komplexu TFIID s odlišným podjednotkovým složením²⁵. Byla

objevena i zcela tkáňově specifická podjednotka TAF_{II}105, která se vyskytuje výlučně v B-lymfocytech²⁶.

A. Klasická cesta



B. Holoenzymová cesta



Obr. 4: Klasická a holoenzymová cesta tvorby preiniciačního komplexu. Pol II značí RNA polymerasu II.

1.2.2 Modulární stavba transkripčních faktorů

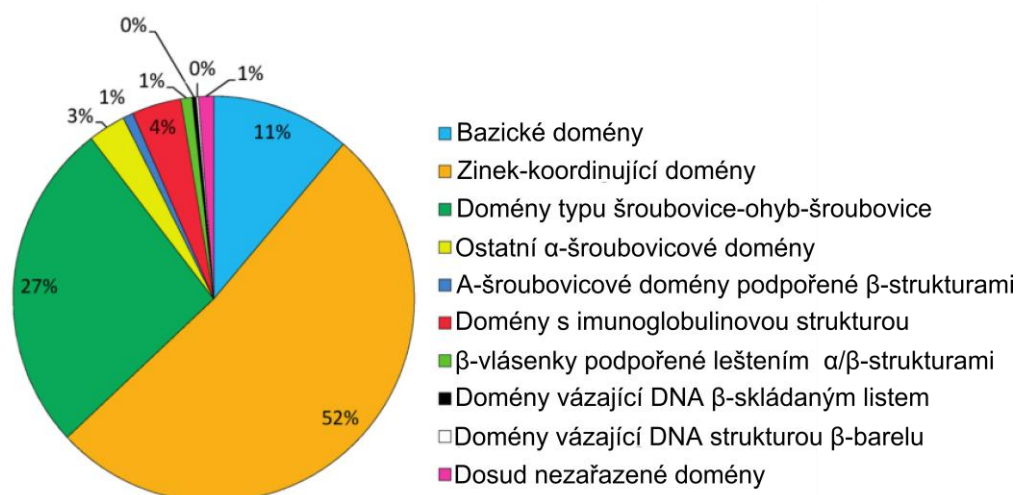
Transkripční faktory vykazují modulární stavbu. Lze u nich definovat regiony (modul) odpovědné za zcela konkrétní funkci. Základní moduly rozlišované u všech transkripčních faktorů jsou DNA vazebná doména (DBD, z angl. *DNA-binding domain*) a transaktivační doména (TAD, z angl. *trans-activating domain*). Termín transaktivační zastřešuje jak domény aktivující, tak inhibující transkripci. Fakultativně se vyskytují ligand-vázající domény (LBD, z angl. *ligand-binding domain*)²⁷.

1.2.2.1 DNA vazebné domény a klasifikace transkripčních faktorů

Úlohou DNA vazebné domény (DBD) je specificky rozpoznat konkrétní nukleotidovou sekvenci či skupinu nukleotidových sekvencí. DBD ve srovnání s transkripčními a ligand-vázajícími doménami vykazují největší míru strukturní uspořádanosti, což dokazují mnohé, již vyřešené prostorové struktury.

Klasifikace transkripčních faktorů na základě struktury jejich DBD dělí domény do deseti superrodin, z nichž první tři, nejrozsáhlejší a nejvíce prostudované (viz Obr. 5, str. 9), budou diskutovány detailněji²⁸:

1. Bazické domény
2. Zinek-koordinující domény
3. Domény typu šroubovice-ohyb-šroubovice
4. A-šroubovicové domény podpořené β -strukturami (z angl. *Alpha-helices exposed by beta-structures*)
5. Domény s imunoglobulinovou strukturou (z angl. *Immunoglobulin fold*)
6. Beta-vlášeny podpořené lešením α/β struktur (z angl. *Beta-hairpin exposed by an alpha/beta-scaffold*)
7. Domény vázající DNA β -skládaným listem (z angl. *Beta-sheet binding to DNA*)
8. Domény vázající DNA strukturou β -barelu (z angl. *Beta-barrel DNA-binding domains*)
9. Doposud nezařazené domény



Obr. 5: Diagram poměrného zastoupení dosud známých transkripčních faktorů v jednotlivých superrodinách. Převzato a upraveno z²⁸.

Bazické domény mají velký nadbytek kladného náboje a v roztoku se pravděpodobně vyskytují jako nestrukturovaná vlákna. DNA váží jako dimery. Dimerizaci zajišťují zvláštní domény často tvořené leucinovými zipy nebo motivy šroubovice-ohyb-šroubovice. Po vazbě na DNA tvoří α -šroubovicovou strukturu²⁹.

První **zinek-koordinující doménou** byla doména TFIIIA³⁰. Ve struktuře DBD faktoru TFIIIA jsou 30 aminokyselin dlouhé opakující se úseky. 25 z těchto 30 aminokyselin tetraedrálně obklopuje atom zinku a tvoří tak kompaktní jednotku běžně nazývanou „zinkový prst“. Zbylých 5 aminokyselin tvoří spojku s další jednotkou. Každá jednotka obsahuje sedm vysoce konzervovaných aminokyselinových zbytků, z nichž čtyři (dva cysteinové a dva histidinové) koordinují atom zinku a tři další tvoří hydrofobní jádro jednotky. Tyto konzervované zbytky jsou základem prostorové struktury prstu, přičemž ostatní udávají vazebnou specifitu. Zinkové prsty jsou strukturně nezávislé a svou strukturu v roztoku si udrží i při separaci od zbytku molekuly. Konkrétní DBD různých transkripčních faktorů této superrodiny se liší mj. počtem prstových jednotek a konzervovanými zbytky, na základě čehož jsou dále děleny do jednotlivých rodin³¹.

Základním strukturním prvkem superrodiny **šroubovice-ohyb-šroubovice** jsou tři α -šroubovice tvořící jakýsi otevřený pravotočivý svazek. Mezi druhou a třetí šroubovicí dochází k prudkému ohybu. Tento základní motiv je u jednotlivých rodin doplněn např. čtvrtou šroubovicí nebo smyčkou s antiparalelním β -skládaným listem připomínajícím křídlo. Šroubovice číslo tři interaguje s velkým žlábkem DNA³².

1.2.2.2 Ligand-vázající domény

Ligand-vázající domény (LBD) se nejčastěji nachází u jaderných receptorů (z angl. *nuclear receptor*). Jaderné receptory jsou široká skupina transkripčních faktorů, jejichž aktivita je primárně modulována přítomností ligandu v buňce. Mezi jejich ligandy patří řada malých hydrofobních molekul schopných volně procházet plazmatickou membránou, jako jsou steroidní hormony, vitaminy nebo intermediáty buněčného metabolismu³³.

Ligand-vázající domény jaderných receptorů se skládají z 12 α -šroubovic, které společně vytvářejí kavitu vázající ligand. Specificita LBD je nepřímo úměrná velikosti její kavity. Apo-receptor (bez navázaného ligandu) má vyšší afinitu vůči ko-represorům než ke ko-aktivátorům transkripčních faktorů. Po navázání ligandu dojde ke konformačním změnám a zvýšení rigidity, což vede ke zvýšení afinity ke ko-aktivátorům. Zjednodušeně je LBD molekulární přepínač mezi inhibiční a aktivační modulací³⁴.

1.2.2.3 Aktivační domény

Aktivační domény jsou oproti DBD obecně méně strukturně uspořádané a evolučně konzervované. Většina aktivačních domén nabývá stálé struktury až po navázání ko-regulačního proteinu. I přesto bývají dle určitých podobností členěny do tří skupin:

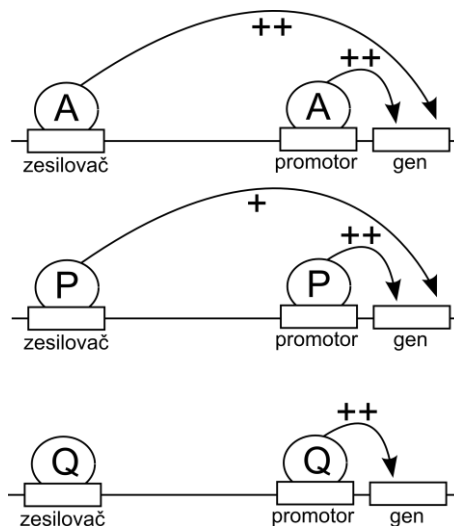
1. Kyselé domény
2. Domény bohaté na glutamin
3. Domény bohaté na prolin

Kyselé domény jsou majoritním typem aktivačních domén. Obsahují vysoký podíl záporně nabitých aminokyselinových zbytků, které doméně udělují celkový záporný náboj. Vzniklé coulombické repulze prakticky znemožňují vytvoření stabilnější struktury v roztoku, ve kterém se vyskytují v podobě negativně nabitých provazců³⁵. Zvyšování podílu kyselých aminokyselin vede ke zvýšení schopnosti aktivovat transkripční aparát bez ohledu na jejich umístění v sekvenci. Stejně tak pozice přirozeně se vyskytujících kyselých zbytků nejsou mezi jednotlivými zástupci konzervovány. Snížení, ne však úplné vymizení, aktivační schopnosti lze pozorovat při mutaci několika hydrofobních zbytků. Tyto jevy vysvětluje dvoukrokový mechanismus interakce postulovaný pro TF c-myc, který svou aktivační doménou mj. váže TBP (kap. 1.2.1). V prvním kroku dochází k atrakci nabitých

vazných míst obou partnerů. Důležitým parametrem prvního kroku je schopnost elektrostatických sil působit efektivně na značnou vzdálenost. V druhém kroku dochází k vytvoření stabilní struktury aktivační domény (α -šroubovice nebo β -skládaný list), přičemž je z důležitých hydrofobních zbytků vytvořena oblast, která Van der Waalsovými silami působícími na krátkou vzdálenost stabilizuje interakci s TBP³⁶. Dvoukrokový mechanismus byl potvrzen i u dalších aktivátorů a zdá se tak být mechanismem obecným. Výhodou mechanismu, při kterém až při samotné vazbě cílové molekuly dochází k vytvoření stabilní struktury z předem neuspořádaného řetězce, je možnost přizpůsobit se většímu množství interakčních epitopů. Kyselé aktivační domény jsou proto schopné rekrutovat širokou paletu různých regulačních molekul.

Domény bohaté na glutamin či prolin jsou dosud jen málo prostudované. Obsahují minimum negativně nabitých zbytků. Schopnost aktivovat transkripci nesouvisí s polohou glutaminových, respektive prolinových zbytků³⁷.

Všechny tři skupiny aktivačních domén pravděpodobně vykazují různé mechanismy aktivace transkripce, na což poukazují výsledky experimentů, při kterých byla studována schopnost aktivačních domén fúzovaných ke stejné DBD stimulovat transkripci po vazbě na RE umístěné v různé vzdálenosti od promotorové oblasti (viz Obr. 6, str. 12). Kyselé domény aktivovaly transkripci jak po vazbě RE umístěného blízko promotoru, tak po vazbě vzdáleného RE. Domény bohaté na glutamin aktivovaly transkripci jen z oblastí blízkých promotoru. Domény bohaté na prolin aktivovaly transkripci z obou pozic, avšak silnější aktivace byla pozorována u regionů bližších promotoru. Jednotlivé typy mechanismů, které jsou dosud zmapovány převážně pro majoritní skupinu kyselých aktivačních domén, jsou předmětem následujících kapitol^{38,39}.



Obr. 6: Znázornění schopnosti aktivačních domén aktivovat transkripci z různých vzdáleností od cílového genu u kyselých domén (A), prolinových domén (P) a glutaminových domén (Q). Silná stimulace reprezentována „++“, slabá pak „+“.

1.2.3 Pozitivní modulace exprese genů

Aktivace genové exprese transkripčními faktory je možná na třech odlišných úrovních. Transkripční faktory uvolňují těsnou selenoidní strukturu chromatinu, umožňují vazbu dalších aktivačních faktorů, které stimulují tvorbu PIC (kap 1.2.1). Dále se pravděpodobně podílejí i na regulaci elongace transkriptu.

1.2.3.1 Ovlivnění preiniciačního transkripčního komplexu

Transkripční faktory aktivují PIC dvěma způsoby. Zvyšují míru tvorby preiniciačního komplexu rekrutováním faktorů TFIID a TFIIB (kap. 1.2.1)^{40,41}. Vedle interakce s jednotlivými TF v rámci postupné tvorby PIC rekrutují aktivační domény i celý komplex holoenzymu Pol II (kap. 1.2.1)⁴². Druhou možností ovlivnění PIC, která následuje po vazbě faktorů transkripčního komplexu, je zvýšení jejich aktivity nebo stability vazby^{43–46}.

Vedle minoritních přímých interakcí TF s PIC, byla nalezena majorita TF a dalších regulačních proteinů, které tvorbu či aktivitu PIC ovlivňují nepřímo skrze ko-aktivátory transkripce. V rámci početné skupiny ko-aktivátorů zaujímá zcela zásadní postavení rozsáhlý multiproteinový komplex zvaný mediátor. Přítomnost mediátorového či obdobného komplexu se striktně váže na eukaryotickou transkripci. Mediátor, stejně jako ostatní komponenty PIC, neváže DNA, ale je do specifických promotorových oblastí cílen pomocí TF s DBD. Jak již bylo zmíněno v kap. 1.2.1, mediátor usnadňuje tvorbu PIC. TF

vedle přímého rekrutování složek PIC mohou jeho tvorbu ovlivnit nepřímo skrze mediátor. Komplex mediátoru sestává z nejméně 20 podjednotek. Jeho prostorová struktura, stejně jako podjednotkové složení, je velmi flexibilní. Velká část komplexu je tvořena úseky s neuspořádanou strukturou. Této flexibilitě odpovídá i široká paleta možných kooperací s dalšími proteiny a složkami PIC a strukturních změn vedoucí k rozsáhlým regulačním schopnostem komplexu, z nichž ne zcela všechny byly dosud prostudovány.

Důležitou regulační úlohu hraje vazba mediátoru na C-koncovou doménu RNA polymerasy II, jejíž fosforylace je zásadní pro aktivaci RNA polymerasy. Další z mnoha funkcí mediátoru je schopnost indukovat remodelaci chromatinu (kap 1.1.1). Mediátor váže faktory remodelující chromatin a zároveň reguluje jejich funkci. Jedna z podjednotek mediátorového komplexu má dokonce sama histon acetyltransferasovou aktivitu⁴⁷.

Přes velmi intenzivní výzkum mediátorového komplexu jsou dnešní informace o jeho fungování spíše kusé. I tak se odborná veřejnost shoduje na tom, že mediátorový komplex je zcela zásadním článkem v procesu regulace transkripce, jehož úlohou jako ko-aktivátoru je být prostředníkem pro přenos signálů od regulačních molekul, převážně TF, ke komplexu RNA polymerasy II⁴⁸.

1.2.3.2 Ovlivnění histonů a struktury chromatinu

Vliv modifikací histonů na regulaci transkripce, převážně skrze změnu struktury chromatinu, byl popsán v kapitole 1.1.1. Enzymy modifikující histony vystupují v regulační kaskádě v roli ko-regulátorů transkripčních faktorů. TF zajišťují těmto ko-regulátorům skrze své DBD specifické cílení nukleosomů nacházejících se v oblasti určené k překladu⁴⁹. Mezi významné ko-aktivátory patří enzymy s histonacetyltransferasovou aktivitou. Vzhledem k bipolárnímu účinku modifikací na výslednou strukturu chromatinu mohou aktivaci způsobit i enzymy, které odstraňují inhibičně působící modifikace⁵⁰.

TF ovlivňují transkripci také skrze interakci s komplexy remodelujícími chromatin (kap. 1.1.1). Obdobně jako u histon-modifikujících enzymů TF faktory vážou tyto komplexy a zajišťují jim specifické rozpoznání úseků DNA⁵¹⁻⁵⁴. Pro interakci jsou zásadní aktivační domény TF. Zdá se, že rekrutování remodelačních komplexů je převážně omezeno

na faktory vázající RE blízké promotoru. TF mohou kromě množství přítomných remodelačních komplexů ovlivňovat i jejich aktivitu⁵¹.

Část komplexů holoenzymu RNA polymerasy II obsahuje remodelující komplexy, které jsou aktivní a schopny ovlivňovat strukturu chromatinu. To usnadňuje opětovné nasednutí RNA polymerasy II na aktivovaný promotor nebo umožňuje elongaci transkripce v případech, kdy rozvolnění chromatinu v promotorové oblasti postačuje k započetí transkripce, ale nepostihuje celou překládanou oblast⁵⁵.

1.2.3.3 Komplexita pozitivní modulace

Aktivace transkripce je vícestupňový proces. Záhájení transkripce obecně vždy vyžaduje rozvolnění chromatinové struktury a poskládání preiniciačního komplexu. Splnění obou podmínek však u většiny genů vede jen k minimální bazální produkci transkriptu. Produkce fyziologické hladiny je vyvolána souhrou dalších modulačních efektů TF a ko-aktivátorů. Výsledná odpověď se odvíjí od integrace více signálů, které zprostředkovávají informaci o aktuálním stavu buňky a jejího okolí.

Některé stupně regulace mohou být aktivovány permanentně. Tím je dosaženo naopak zjednodušení regulace u genů, které nevyžadují před aktivací složitý rozhodovací proces. Například hormonem aktivovaný jaderný receptor způsobí rozvolnění chromatinu a umožní vazbu konstitutivně přítomného TF, který silně aktivuje transkripci. Remodelace chromatinu může být jedinou podmínkou započetí transkripce⁵⁶. Naproti tomu v případě aktivace teplotním stresem je rozhodujícím signálem transkripční faktor tepelného šoku (z angl. *heat shock factor*). Rozvolnění struktury chromatinu před vazbou faktoru teplotního šoku je indukováno stále produkovaným transkripčním faktorem⁵⁷.

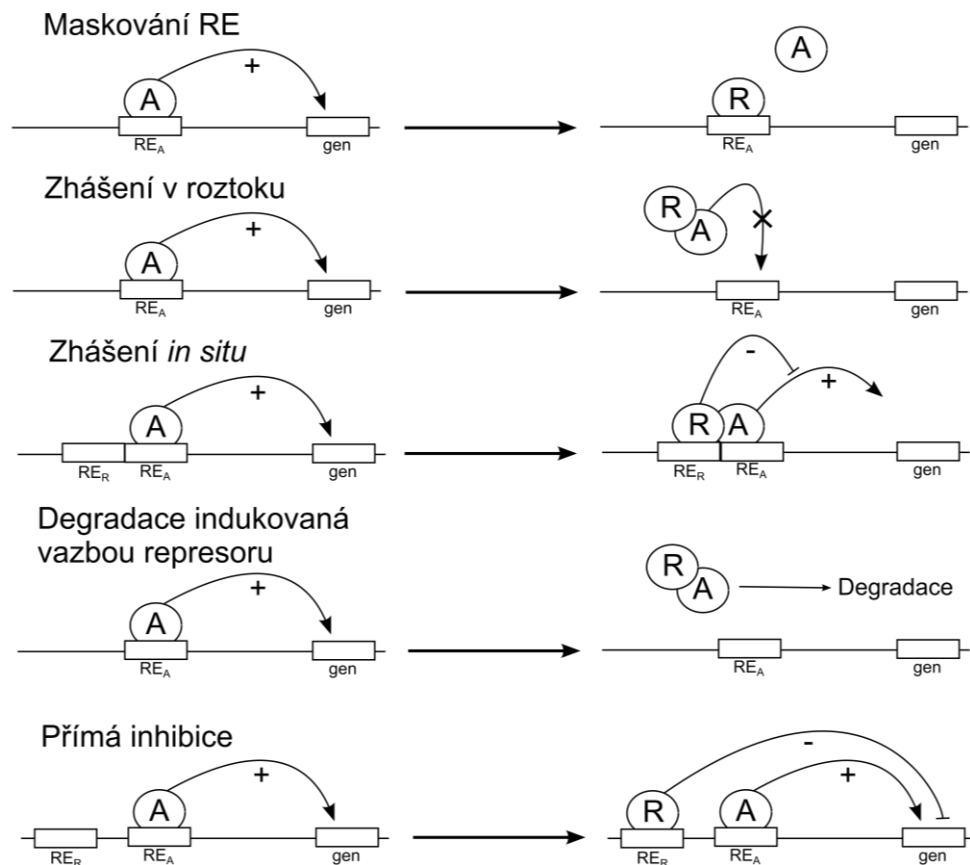
1.2.4 Negativní modulace exprese genů

Negativní modulace exprese genů, genová represe, je důležitým regulačním nástrojem buňky, který umožňuje zvrácení rozhodnutí o přepisu genu na základě porovnání protichůdných signálů. Zvyšuje komplexitu rozhodovacího procesu a umožňuje další korekci tkáňově specifické exprese u jednotlivých buněčných podtypů. Dále umožňuje modulovat bazální hladinu transkripce na základě zvýšené hladiny stimulu i v negativním smyslu.

Přestože budou v následující kapitole represory diskutovány jako ryze inhibiční faktory, často se jedná o případy smíšené funkce transkripčních faktorů, které v rámci regulace jednoho represoru vystupují jako aktivátory, zatímco v rámci druhého jako represory^{58,59}. Ke změně funkce z aktivátoru na represor může dojít i v důsledku působení dalšího faktoru či alternativním sestřihem genu kódujícího transkripční faktor⁶⁰.

1.2.4.1 Nepřímá inhibice

Principem nepřímé inhibice je interakce s aktivační mašinérií, kdy represor interferuje s aktivátorem či ko-aktivátorem a snižuje, až anuluje jejich účinky. Byly popsány tři hlavní nepřímé mechanismy inhibice transkripce: maskování DNA vazebné sekvence aktivátoru, zhášení v roztoku a zhášení *in situ*.



Obr. 7: Možnosti represe transkripce. A – aktivátor, R – represor, RE_R- inhibiční regulační element, RE_A-aktivační regulační element.

Maskováním se rozumí vazba represoru na totožný RE, který bývá při aktivaci vázán aktivátorem, čímž je aktivátoru znemožněna jeho funkce⁶¹.

Ke zhášení (z angl. *quenching*) aktivátoru dochází při protein-proteinové interakci mezi represorem a DBD nebo TAD doménou aktivátoru. Tyto represory lze rozdělit na dvě skupiny podle toho, zda obsahují DBD a váží se poblíž úseku rozpoznávaného aktivátorem⁶², nebo nikoliv⁶³.

Degradace proteinů je obecný mechanismus regulace enzymů, signálních i dalších proteinových molekul nevylučuje transkripční faktory. Represor může TF sám degradovat⁶⁴ nebo jej označit jako cíl degradačního aparátu buňky polyubikvitinací⁶⁵.

1.2.4.2 Přímá inhibice

Přímou inhibicí represor snižuje aktivitu bazálního transkripčního aparátu. Důkazem přímé inhibice je snížení transkripce i v nepřítomnosti aktivátoru. Přímé represory obsahují zvláštní inhibiční domény různých typů, kterými ovlivňují PIC nebo váží ko-represory ovlivňující PIC. Častým motivem inhibičních domén jsou na prolin bohaté domény s absencí nabitých zbytků⁶⁶. Inhibiční domény inhibují buď tvorbu PIC, nebo snižují jeho aktivitu či stabilitu (viz Obr. 7, str. 15).

1.2.4.3 Inhibice na úrovni struktury chromatinu

Jelikož významným mechanismem aktivujícím transkripci genů je rozvolnění struktury chromatinu, inhibiční působení musí naopak zahrnovat tvorbu těsné selenoidní struktury obdobnými, avšak protichůdnými mechanismy. K tomu dochází působením na ATP závislých chromatin remodelujících komplexů⁶⁷ a enzymů modifikujících kovalentní strukturu histonů jako jsou histondeacetylasy⁶⁸.

1.2.4.4 Jaderný RNA silencing

V posledních letech je stále větší význam regulace exprese připisován umlčování RNA transkriptů malými molekulami RNA (z angl. *RNA silencing*). Vedle cytoplasmatické cesty umlčování existuje i podobná jaderná cesta. Zatímco podstatou cytoplasmatické cesty je degradace RNA transkriptu proteinovým komplexem RISC (z angl. *RNA-induced silencing complex*) na základě komplementarity s krátkým přibližně 20 až 25 nukleotidů dlouhým řetězcem tzv. malé interferující RNA, siRNA (z angl. *small interfering RNA*), mechanismus jaderného umlčování zahrnuje modifikaci histonů a alteraci chromatinové

struktury. Komplex RIST (z angl. *RNA-induced transcriptional silencing*), který je příbuzný komplexu RISC a podílí se na jaderném umlčování, váže siRNA, na základě jejíž sekvence komplementárně váže jeden z řetězců rozvinuté DNA šroubovice nebo vznikající RNA transkript. Součástí komplexu RIST jsou histon methyltransferasy, které pravděpodobně indukují remodelaci chromatinu a tím způsobují inhibici transkripce regulovaného genu⁶⁹.

1.3 Regulace transkripčních faktorů

Základní vlastnosti TF, schopnost vázat specifické úseky DNA a aktivovat či inhibovat transkripci, již byly uvedeny. Výsledná regulace transkripce je odpovědí na určité signály vycházející z vnějších stimulů nebo vnitřního prostředí buňky. TF jsou tedy pouze součástí složitých signálních drah, kde zajišťují převedení signálů na tvorbu proteinových molekul, které zpětně ovlivňují prostředí buňky. TF hrají roli prostředníků a musejí být tudíž také regulovány. Možnosti regulace jsou v zásadě dvě: regulace syntézy a regulace aktivity. Jako v jiných případech nejsou většinou tyto mechanismy v případě konkrétního faktoru striktně odděleny a aktivita výsledného faktoru je dána souhrnem obou regulačních mechanismů.

1.3.1 Regulace syntézy

Regulace syntézy TF je pro buňku energeticky nejvýhodnější, protože buňka nevynakládá energii na syntézu neaktivních faktorů nebo na jejich inhibici. Tento mechanismus je ale v porovnání s regulací aktivity časově značně náročnější. Tento typ regulace je nejčastěji využíván pro kontrolu aktivity faktorů, které udržují profil exprese indukující určitý buněčný typ nebo vývojové stádium buňky, tedy pro dlouhodobě působící faktory. K zásahům do syntézy dochází především na úrovni transkripce a posttranskripčních úprav.

K regulaci na úrovni transkripce dochází indukcí změn chromatinové struktury⁷⁰ či přímou stimulací transkripčního aparátu⁷¹. Při posttranskripční regulaci vznikne z jednoho RNA transkriptu alternativním sestřihem dvě nebo více variant mRNA pro TF, z nichž jedna kóduje aktivní faktor, zatímco ostatní verze postrádají některé funkce a jsou neaktivní. V takovýchto případech lze ovlivněním sestřihového aparátu měnit poměr mezi aktivní a neaktivní formou a tím ovlivňovat syntézu výsledného aktivního TF^{72,73}.

Regulace určitého faktoru může zahrnovat přepis jeho genu ve všech buňkách, přičemž k překladu dojde jen v určitých buněčných typech. Translace je však k regulaci syntézy TF využívána jen ve výjimečných případech. Prozatím byl tento mechanismus popsán u kvasinek⁷⁴.

1.3.2 Regulace aktivity transkripčních faktorů

Regulace syntézou, diskutovaná v předchozím odstavci, vyžaduje přítomnost nadřazeného TF, který musí být sám produkován pod kontrolou jiného faktoru. Regulace syntézou tedy nevysvětluje počátek rozhodovacího procesu, ale spíše naznačuje princip, kterým je možné jedním transkripčním faktorem regulovat po delší dobu větší skupinu genů. Je zřejmé, že na počátku rozhodovacího procesu musí existovat faktor produkováný v neaktivní formě, který je v případě potřeby převeden na formu aktivní.

Regulace aktivity TF představuje rychlý a flexibilní způsob aktivace transkripčního faktoru. Důkazem tohoto typu regulace je schopnost indukce transkripce v přítomnosti inhibitorů syntézy proteinů. Jedná se o dominantní přímý způsob, kterým mohou buněčné signální dráhy ovlivňovat aktivitu transkripčních faktorů a tím expresi genů. V případě transkripčních faktorů z rodiny jaderných receptorů je molekula registrující signál sám TF (kap. 1.2.2.2). Častější je přítomnost většího množství signálních molekul kooperujících v průběhu signálního procesu na přenosu signálů z receptorové molekuly na TF, což umožňuje amplifikaci signálů, interakci protichůdných signálů a jemné korekce signalizace⁷⁵. Možnosti regulace aktivity TF jsou stejné jako možnosti regulace aktivity ostatních proteinů a zahrnují protein-proteinové interakce⁷⁶, vazbu ligandu⁷⁷, posttranslační modifikace a regulaci degradace.

Mezi posttranslační modifikace hrající roli v regulaci aktivity TF patří: fosforylace⁷⁸, acetylace, ubikvitinace a sumoylace, methylace a nejméně v jednom případě i oxidace v podobě tvorby disulfidového můstku⁷⁹. Modifikované části proteinu jsou pak rozpoznávány ko-regulátory a dalšími proteiny, které jsou schopné modulovat transkripční aktivitu. Běžnou modifikací je fosforylace serinových a threoninových zbytků. Fosforylace zavádí do molekuly významný negativní náboj, který může zásadně měnit vazebné možnosti povrchu proteinu a jeho strukturu. Acetylace lysinových zbytků, stejně jako fosforylace, významně mění rozložení náboje na proteinovém povrchu. Acetylace histonů byla dříve uvedena jako významný mechanismus regulující architekturu chromatinu (kap.

1.1.1.2). Vedle histonů jsou cílem acetylace i mnohé TF, u kterých je tato modifikace spojena se změnou aktivity⁸⁰. Methylace transkripčních faktorů na lysinových a argininových zbytcích je, stejně jako acetylace, vykonávána enzymy, které methylují histony. Stejně jako u methylace histonů záleží výsledný efekt na počtu a umístění methylových skupin⁸¹.

Polyubikvitinace lysinových zbytků u TF určených k degradaci je možným způsobem regulace množství aktivního faktoru. Nevýhodou této cesty je vysoká energetická náročnost syntézy polypeptidového řetězce, který je následně bez využití degradován⁸². Lysinové zbytky jsou vedle polyubikvitinace cílem modifikace mající zcela opačný účinek – sumoylace. Připojení proteinu SUMO-1 (z angl. *small ubiquitin-related modifier 1*) místo ubikvitinu brání degradaci faktoru⁸³.

1.4 Transkripční faktory třídy Forkhead box /Winged helix

Forkhead box rodina transkripčních faktorů, alternativně nazývána *Winged helix*, je charakterizována 100 až 110 aminokyselin obsahující, monomerní DNA vazebnou doménou (DBD, z angl. *DNA-binding domain*) typu šroubovice-ohyb-šroubovice s typickou dvojicí smyček připomínající motýlí křídla, z čehož byl odvozen i alternativní název rodiny, *Winged helix*, který lze přeložit jako okřídlené šroubovice. Oficiální název *Forkhead box* je odvozen od vidlice připomínajícího útvaru, který je pozorován na hlavě a zadečkové části embryí octomilek postižených mutací genu pro transkripční faktor Fkh (zakládající člen rodiny *Forkhead box* dnes náležící rodině FoxA)⁸⁴. Tato významná rodina transkripčních faktorů dnes obsahuje více než 100 členů lišících se především transaktivačními doménami, kteří byli na základě fylogenetické analýzy rozděleni do 17 podrodin značených u lidských variant zkratkou FOX a připojeným velkým písmenem přiřazeným abecedně na základě objevení prvního člena (FOXA – FOXQ). Jednotliví členové podrodiny jsou odlišeni arabskou číslicí⁸⁵.

1.4.1 FOXO podrodina

Transkripční faktory podrodiny FOXO jsou významné tumorsupresory mající inhibiční vliv na buněčnou diferenciaci a růst a proapoptotický efekt, jelikož indukují expresi dalších proapoptotických faktorů Bcl2 rodiny, Fas ligandu a zvyšují hladinu různých inhibitorů CDK (z angl. *cyclin-dependent kinase*). Faktory FOXO sdílejí velmi konzervovanou DBD

rozpoznávající tzv. *DAF-16 family member-binding element* (5'-GTAAACAA-3', DAF-16 je orthologní protein faktorů FOXO izolovaný z červa *Caenorhabditis elegans*)⁸⁶. FOXO faktory jsou u savců produkovány konstitutivně⁸⁷.

1.4.2 FOXO4

Jedním z členů rodiny FOX je i transkripční faktor FOXO4. Jedná se o TF zahrnutý v buněčné signalizaci týkající se odpovědi na oxidativní stres, regulace proliferace a buněčného metabolismu. FOXO4 je ve zvýšené míře exprimován ve svalové a adiposní tkáni⁸⁷. Detaily zapojení faktoru FOXO4 do signálních drah a možnosti jeho regulace jsou předmětem následujících kapitol, kde budou podrobněji rozebrány.

Gen kódující FOXO4 byl identifikován na základě výsledků výzkumu translokací vyskytujících se v oblasti 11q23 u případů akutní nelymfoblastické leukémie. Většina z 29 identifikovaných translokací zahrnovala narušení genu MLL (z angl. *mixed-lineaged leukemia*, gen pro histonmethyltransferasu) a vede k jeho fúzi s různými partnery. MLL i fúzní partneři obsahují motivy typické pro transkripční faktory. K fúzi dochází většinou v oblasti kódující DBD. Takovéto translokace vedou k tvorbě fúzního transkripčního faktoru, který bývá buď konstitutivně aktivní, nebo naopak ztrácí schopnost aktivovat transkripci. V případě faktoru FOXO4 byly objeveny dva typy fúzního TF: FOXO4-MLL a MLL-FOXO4, přičemž druhý zmíněný je spojován s tvorbou onkogenních onemocnění⁸⁸. Těmito poznatky byl mj. motivován další výzkum přirozených funkcí jednotlivých fúzních partnerů.

1.5 Regulace FOXO4 posttranslačními modifikacemi

1.5.1 Fosforylace a buněčná lokalizace

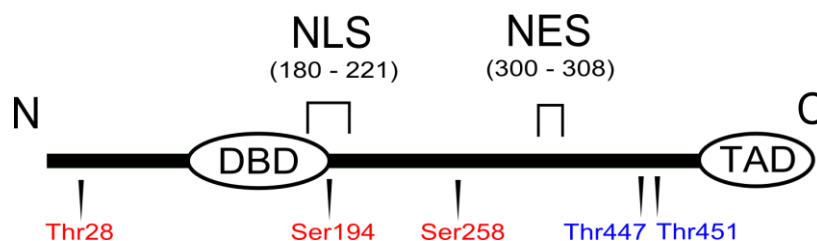
Ústřední posttranslační modifikací regulující schopnost FOXO4 aktivovat transkripci je fosforylace jeho serinových a threoninových zbytků. Enzymy fosforylující FOXO4 jsou především efekty dvou důležitých signálních drah – PI3K (z angl. *phosphatidylinositol-3-kinase*) dráhy a Ral/JNK (z angl. *Ras-like GTPase* a *c-Jun N-terminal kinase*) dráhy. Konkrétně se jedná o protein kinasu B (PKB, z angl. *protein kinases B*) v případě PI3K dráhy a c-Jun N-koncovou kinasu (JNK) v případě Ral/JNK dráhy⁸⁹⁻⁹¹.

PKB fosforyluje FOXO4 dominantně na jednom threoninovém (T28) a na dvou serinových zbytcích (S193, S258) (viz Obr. 8, str. 22). Fosforylace FOXO4 kinasami PKB zvyšují transport FOXO4 z buněčného jádra do cytoplasmy a snižují jeho transkripční aktivitu. Pro zvýšení cytoplasmatické lokalizace jsou zásadní modifikace T28 a S193⁹². Fosforylace na těchto residuech vytvoří dvě vazná místa rozpoznávaná zeta formou chaperonového proteinu 14-3-3. Transkripční faktor FOXO4 obsahuje stejně jako ostatní členové podrodiny FOXO dva regiony zodpovědné za interakci s komplexy jaderných pórů, které zajišťují specifickou výměnu proteinů mezi cytoplasmou a buněčným jádrem. Konkrétně se jedná o region NLS (z angl. *nuclear localization sequence*) navazující na DBD v rozsahu zbytků 180 – 221 zajišťující transport do jádra a region NES (z angl. *nuclear export sequence*) v pozici 300 – 308 zajišťující transport z jádra zpět do cytoplasmy (viz Obr. 8, str. 22). Součástí NLS regionu je i jedno z vazných míst pro 14-3-3 ζ . Tento protein se vyskytuje ve formě dimeru, který má nízkou afinitu k jednou fosforylovanému FOXO4 v pozici T28 nebo S193 a řádově vyšší afinitu k dvakrát fosforylovanému faktoru ($K_D < 30$ nM). Při fosforylaci obou zbytků dojde k vytvoření dvou vazných míst a vzniku stabilního komplexu FOXO4 s 14-3-3 ζ v poměru 1:2, přičemž vazba chaperonového proteinu změní flexibilitu NLS regionu⁹³ tak, že není schopen interagovat s jadernými transportními komplexy. Vzhledem k faktu, že region NES není ovlivněn, dojde k posunu rovnováhy lokalizace FOXO4 ve prospěch cytoplasmy. Zároveň s objevením tohoto mechanismu regulace transportu bylo prokázáno, že samotná fosforylace T28 a S193 ani tvorba komplexu FOXO4/14-3-3 ζ neovlivňuje schopnost tvořit komplex FOXO4 resp. FOXO4/14-3-3 ζ s DNA, zatímco v přítomnosti proteinu 14-3-3 ζ je tvorba komplexu FOXO4/(14-3-3 ζ)₂ s DNA značně omezena⁹⁴.

Je zřejmé, že v případě jakéhokoliv transkripčního faktoru je jaderná lokalizace zásadní pro interakci jeho DBD s příslušným RE. V případě faktoru FOXO4 se pravděpodobně jedná o jeden z dominantních způsobů regulace transkripční aktivity modulovaný aktivitou PI3K/PKB signální dráhy.

Zajímavým fenoménem spojeným s regulací faktorů FOXO PI3K/PKB drahou je tzv. FOXO/PKB sendvič (z angl. *sandwich*). Podstatou FOXO/PKB sendviče je indukce exprese proteinů transkripčním faktorem, které zároveň vystupují jako součást signální dráhy na vyšší úrovni než faktor FOXO4 a aktivují kinasu PKB. Tím zpětnovazebně

inhibují jeho aktivaci. Takovýto mechanismus zpětnovazebné inhibice signálu umožňuje rychlé binární přepínání odpovědi buňky na stres⁹⁵.



Obr. 8: Schematické zobrazení struktury FOXO4 s vyznačenými cíly kinas PKB (červeně) a JNK (modře). Dále jsou zobrazeny DNA vazebná doména (DBD), jaderná lokalizační sekvence (NLS), jaderná exportní sekvence (NES) a transaktivační doména (TAD). Reprodukováno na základě⁹².

Druhou již zmíněnou kinasou podílející se na fosforylaci FOXO4 je c-Jun N-koncová kinasa, která fosforyluje FOXO4 na threoninových zbytcích v pozicích 447 a 451. Tyto fosforylace způsobují zvýšení transkripční aktivity a translokaci z cytoplasmy do buněčného jádra a podporují monoubikvitinaci (viz kap. 1.5.3). Na rozdíl od fosforylace kinasou PKB nenarušují fosforylace threoninových residuí kinasou JNK interakci s proteinem 14-3-3 ζ ⁹⁰. Cílem kinasy JNK je vedle FOXO4 i protein 14-3-3 ζ . Fosforylace proteinu 14-3-3 ζ vede ke snížení jeho interakce s FOXO4⁹⁶ a tím dále posiluje jeho jadernou lokalizaci. Navíc tento mechanismus vysvětluje možné převážení aktivačních účinků Ral/JNK dráhy nad inhibičními účinky PI3K/PKB dráhy.

1.5.2 Acetylace

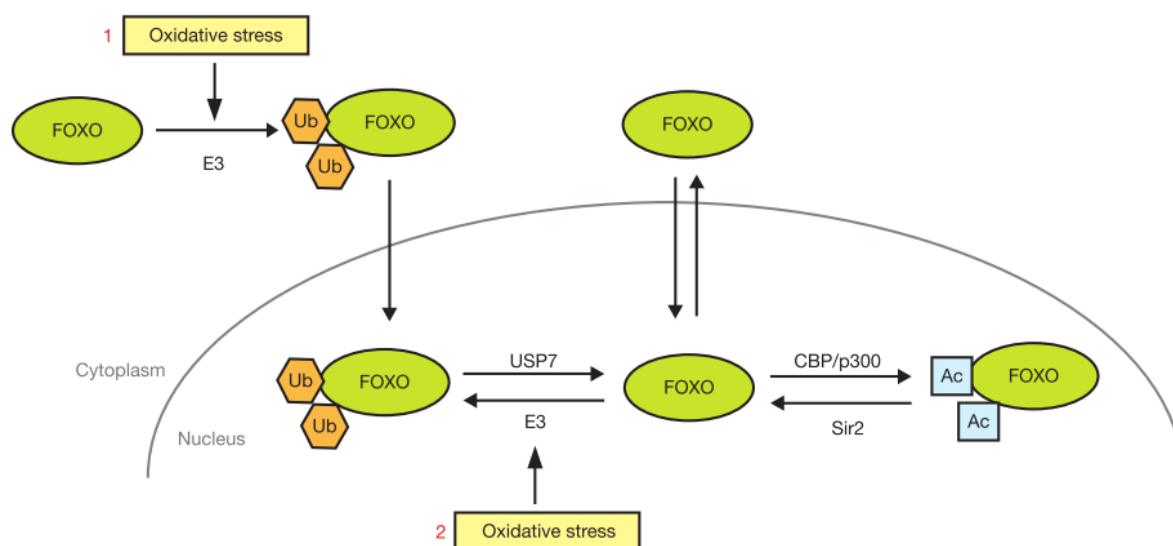
FOXO4 je mimo fosforylace regulováno i acylací několika jeho lysinových zbytků. Modifikujícími enzymy jsou zástupci histonacetyltransferas (CBP, z angl. *binding protein of cyclic AMP response element binding protein*, a p300), které běžně vystupují v pozici ko-regulátorů (viz kap. 1.2.3.2) zprostředkovávajících acylaci histonů považovanou za jeden z mechanismů aktivace transkripce (viz kap. 1.1.1). Acetylace FOXO4 snižuje jeho transkripční aktivitu. Obdobně, jako lze aktivaci transkripce acylací histonů zvrátit aktivitou histondeacetylasy, je i regulace FOXO4 ovlivněna činností deacetylasy^{97,98}.

U ostatních členů podrodiny FOXO byl postulován mechanismus aktivace transkripce využívající právě histonacetyltransferasy. Faktorem rekrutované acetyltransferasy modifikují molekuly histonů, čímž způsobí rozvolnění chromatinové struktury a umožní

tak přepis regulovaných genů. Zároveň však modifikují i samotný transkripční faktor, čímž sníží jeho aktivitu. Výsledkem takovéto regulace je opět jako v případě signalizace skrze PI3K/PKB dráhu (viz kap. 1.5.1) rychlé binární přepínání mezi aktivní a neaktivní signalizací odpovědi na stres. Předpokládá se, že obdobný mechanismus aktivace bude uplatňován i v případě faktoru FOXO4^{99,100}.

1.5.3 Ubikvitinace

FOXO4 je za podmínek oxidativního stresu na četných lysinových zbytcích monoubikvitinováno specifickou E3 ligasou. Ubikvitinace způsobuje zvýšení transkripční aktivity a indukuje jadernou lokalizaci¹⁰¹. FOXO4 je dále vázáno deubikvitinačním enzymem, který proteolyticky odstraňuje ubikvitin. Tato vazba je posílena taktéž za podmínek oxidativního stresu. Ubikvitinace FOXO4 je *in vivo* modifikací transientní¹⁰².



Obr. 9: Model regulace aktivity faktorů FOXO ubikvitinací/deubikvitinací a acetylací/deacetylací. Model předpokládá cytoplasmatickou monoubikvitinaci za podmínek oxidativního stresu vedoucí k jaderné lokalizaci a aktivaci FOXO4. Následuje deubikvitinace proteasou (USP7), která umožní pomalou acetylaci acetyltransferasou CBP. Acetylace vyústí v deaktivaci jaderně lokalizovaného FOXO4. Celkově tento model popisuje způsob, jakým buňka reguluje časově omezenou aktivaci transkripčního faktoru FOXO4. Ub = ubikvitin, Ac = acetylová skupina, E3 = ubikvitin ligasa . Převzato z¹⁰².

Ubikvitinace, stejně jako acetylace, probíhá na lysinových zbytcích. Obě modifikace však působí protichůdně, přičemž si vzájemně konkurují. K ubikvitinaci dochází mnohem rychleji než k acetylaci. Na základě těchto pozorování byl navržen model předpokládající monoubikvitinaci faktoru FOXO (viz Obr. 9, str. 24), která způsobí translokaci do jádra nebo zadržení v jádře. Následná deubikvitinace umožní odstraněním ubikvitinu opětovnou

aktivaci a usnadní export z jádra. Volné lysiny mohou být acetylovány CBP (viz kap. 1.5.2), čímž dojde k dlouhodobému snížení aktivity FOXO4. Celkově tento popisuje způsob, jakým buňka reguluje časově omezenou aktivaci FOXO4. Alternativně mohou vysoké hladiny E3 ligasy způsobit polyubikvitinaci¹⁰³, která již byla popsána jako obecný mechanismus regulace TF (viz kap. 1.2.4.1).

1.6 Zapojení FOXO4 do buněčné signalizace

1.6.1 Regulace odpovědi na oxidativní stres

Reaktivní formy kyslíku (ROS, z angl. *reactive oxygen species*) vznikají přirozeně jako vedlejší produkt metabolismu kyslíku v buňce. V optimálních podmínkách nejsou pro buňku zátěží a představují důležitý prvek v buněčné signalizaci. Stresové podmínky jako např. UV záření či vystavení teplotám mimo teplotní optimum mohou navodit zvýšenou produkci ROS vedoucí k poškození jak informačních (DNA), tak efektorových molekul (proteiny, lipidy).

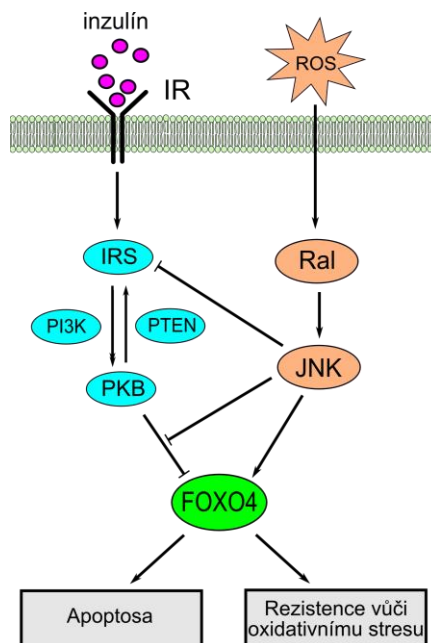
FOXO4, jak již bylo uvedeno v kap. 1.5.1, je regulováno dvěma signálními drahami (PI3K/PKB a Ral/JNK), jejichž signalizace vyústí v různé fosforylační schéma FOXO4 se zcela protichůdnými důsledky na jeho transkripční aktivitu. Za normálních podmínek je aktivita FOXO4 negativně regulována skrze PI3K/PKB dráhu podřízenou hormonální signalizaci inzulínu a inzulínovému růstovému faktoru (z angl. *insulin-like growth factor*)¹⁰⁴.

Mírné zvýšení hladiny ROS způsobí aktivaci malé GTPasy Ral, což vede k fosforylační aktivaci stresové kinasy JNK. Aktivovaná JNK dále fosforylací threoninových zbytků indukuje monoubikvitinaci, jadernou lokalizaci (viz kap. 1.5.3) a aktivaci FOXO4. Aktivované FOXO4 navozuje zvýšenou expresi enzymů odpovědi na oxidativní stres, především superoxidodismutasy a katalasy, jejichž aktivitou dochází ke snížení hladiny ROS odbouráním až na H₂O. FOXO4 dále ovlivňuje buněčný cyklus ve smyslu zamezení v přechodu do jeho S fáze (viz kap. 1.6.2). Tímto umožňuje DNA reparačním enzymům opravit možné poškození DNA související se zvýšenou hladinou ROS. Zároveň JNK negativně ovlivňuje signální dráhu PI3K/PBK, čímž snižuje její inhibiční působení na

FOXO4 a dále tak posiluje jeho aktivaci. FOXO4 při mírně zvýšené oxidativní zátěži skrze signalizaci JNK zvyšuje odolnost buňky vůči oxidativnímu stresu⁹⁰.

Výrazné zvýšení hladiny ROS vyústí v inzulin a IGF nezávislou aktivaci PI3K/PKB dráhy, čímž dojde k fosforylaci FOXO4 indukující jeho interakci s proteinem 14-3-3. Dojde k exkreci FOXO4 z jádra, čímž je zamezena jeho transkripční aktivita. Vysoké hladiny ROS způsobí snížení rezistence buňky vůči oxidativnímu stresu. Výsledkem snížení rezistence je ROS indukovaná apoptosa buňky¹⁰⁵ mj. i prostřednictvím ostatních členů rodiny FOXO⁸⁷.

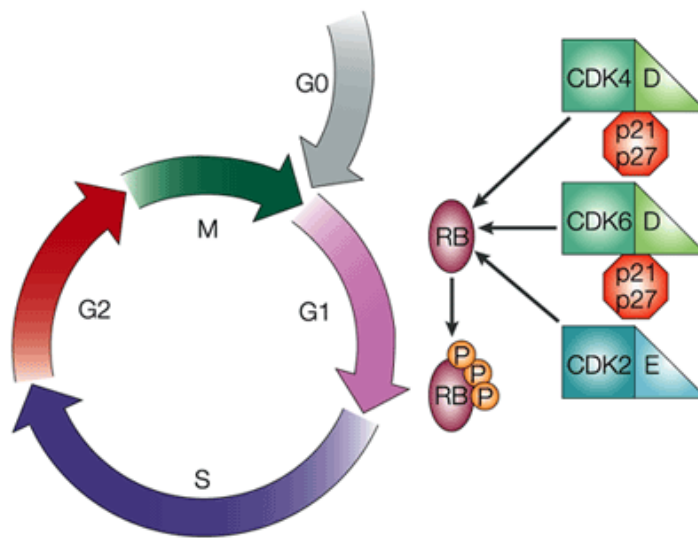
Zdá se, že transkripční faktor FOXO4 ve vztahu k oxidativnímu stresu působí jako integrační bod, ve kterém dochází k vyhodnocení míry oxidativní zátěže a částečně je zde rozhodnuto o tom, zda je míra zátěže ROS pro buňku únosná a je potřeba indukovat stresovou odpověď vedoucí ke snížení hladiny ROS, nebo zda již hladina ROS překročila únosnou mez a snahy o udržení stálosti vnitřního prostředí by mohly vést k fixování poškození DNA¹⁰⁶.



Obr. 10: Schematické znázornění protichůdného působení PI3K/PKB a RalJNK drah. Inzulín a růstové faktory signalizací skrze inzulinový receptor (IR), substrát inzulinového receptoru (IRS) a kinasu PI3K, čímž aktivují proteinkinasu B. PKB dále inhibuje FOXO4, čímž snižuje rezistenci buňky vůči oxidativnímu stresu, a tím nepřímo indukuje apoptosu. Aktivace malé GTPasy Ral reaktivními formami kyslíku (ROS) vede skrze kinasu JNK k aktivaci faktoru FOXO4 a indukuje tak expresi genů zvyšující rezistenci vůči oxidativnímu stresu. Reprodukováno na základě¹⁰⁶

1.6.2 Regulace přechodu z G1 do S fáze buněčného cyklu

Na počátku G1 fáze je aktivita cyklin závislé kinasy 4 (CDK4, z angl. *cyclin-dependent kinase 4*) a cyklin závislé kinasy 6 (CDK6, z angl. *cyclin-dependent kinase 6*) nízká především kvůli absenci D-cyklinových partnerů, které je aktivují. V přítomnosti mitogenů během střední až pozdní G1 fáze hladina D-cyklinů stoupá. Dochází k vytvoření D-cyklin/CDK4 a D-cyklin/CDK6 komplexů, které jako aktivní kinasy fosforylují retinoblastomový protein (z angl. *retinoblastoma protein*). Nefosforylovaný retinoblastomový protein váže faktory E2F (z angl. *E2 promoter binding factor*), které jsou nezbytné pro spuštění transkripce genů indukujících DNA replikaci a vstup do S fáze. Fosforylace retinoblastomového proteinu zmírní inhibiční účinek na E2F mediovanou expresi genů. Jedním z důsledků transkripce E2F aktivovaných genů je zvýšení hladiny E-cyklinů, což vyústí v tvorbu komplexu E-cyklin/CDK2. Tento komplex ještě zvýší míru fosforylace retinoblastomového proteinu, tzv. jej hyperfosforyluje, a tím způsobí nevratný přesun do S fáze buněčného cyklu (viz obr. 11)¹⁰⁷.



Obr. 11: Schematické znázornění komponent regulace buněčného cyklu při přechodu z G1 do S fáze. Komplexy CDK4, CDK6 a CDK2 s příslušnými cykliny zapříčiní hyperfosforylaci retinoblastomového proteinu (pRb), čímž je započata indukce replikace DNA a vstup do S fáze buněčného cyklu. Inhibitory CDK p21 a p27 mohou zamezit fosforylaci pRb a tím zamezit vstupu do S fáze. Převzato z ¹⁰⁷.

Doposud byly objeveny dva mechanismy regulace přechodu z G1 do S fáze buněčného cyklu, na kterých participuje faktor FOXO4. Prvním případem je transkripční aktivace genů CDKN1A (z angl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*, proteinový produkt známý jako p21cip1) a CDKN1B (z angl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*, proteinový produkt známý jako p27kip1)¹⁰⁸. Oba proteiny, p21cip1 i p27kip1, patří mezi inhibitory

CDK2 a CDK4 a jejich zvýšená aktivita vede k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi¹⁰⁹. Druhým příkladem antiproliferativní funkce FOXO4, který není závislý na p21 ani p27, je snížení exprese D-cyklinů, které vyústí ve sníženou fosforylaci retinoblastomového proteinu a zároveň je doprovázeno snížením jeho celkového množství¹¹⁰.

1.6.3 Regulace angiogeneze jako odpověď na hypoxii a hladinu nutrientů

Nastartování angiogeneze z důvodů ischemie je pro vyvíjející se či nádorově bující tkáň životně důležité. Signálem ischemického stavu buňky je především nedostatečné zásobení kyslíkem a živinami. Efektivní stimulace angiogeneze je dosaženo za podmínek hypoxie a sníženého přísunu nutrientů¹¹¹.

Transkripční faktor HIF1 (z angl. *hypoxia-inducible factor*) zajišťující odpověď buňky na hypoxii sestává ze dvou podjednotek HIF1 α a HIF1 β . HIF složený z obou podjednotek je schopen vázat regulační element hypoxie (z angl. *hypoxia response element*) a aktivovat transkripci genů indukujících angiogenezi. Při dostatečném zásobení kyslíkem je podjednotka HIF1 α hydroxylována na dvou prolinech prolyl-4-hydroxylasou. Hydroxylovaný HIF1 α je polyubikvitinován komplexem obsahujícím pVHL (odvozeno z *protein Von Hippel-Lindau*) a následně degradován. Snížená hladina kyslíku v buňce neumožní hydroxylaci prolinových zbytků HIF1 α , čímž znemožní polyubikvitinaci a degradaci⁸².

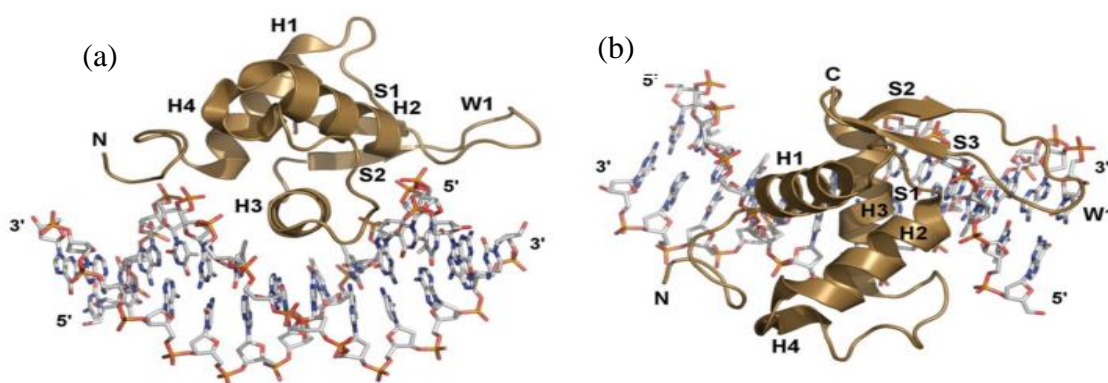
Signální kaskáda PI3K-PKB-FOXO4 zajišťuje ve vztahu k angiogenezi poskytnutí informace o kvalitě krevního zásobení z hlediska množství nutrientů, přičemž tato informace je zprostředkována signalizací inzulinem. V případě nedostatečné signalizace PI3K/PKB dráhy dojde k importu FOXO4 do buněčného jádra a jeho aktivaci vedoucí ke spuštění transkripčních programů, které ve svém důsledku snižují hladinu HIF1 α . Potenciálním prostředníkem se zdá být specifická E3 ubikvitin ligasa, která je mj. odpovědná také za polyubikvitinaci HIF1 α . FOXO4 může inhibovat angiogenezi i za hypoxických podmínek, tedy i v případech rapidně rostoucích tumorů. Tomu odpovídá i častý výskyt poruchy PI3K/PKB signální dráhy způsobený nefunkčním proteinem PTEN (z angl. *phosphatase and tensin homolog*), který zajišťuje přirozenou inhibici PI3K/PKB

dráhy. Deaktivace PTEN vede ke konstitutivní aktivaci PI3K/PKB dráhy a konstitutivní inhibici FOXO4¹¹¹.

1.7 Prostorová struktura FoxO4-DBD

K dnešnímu dni existují v databázi RSCB (z angl. *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics*) sdružující veškeré publikované struktury biologických makromolekul dva modely navržené pro DBD i pro komplex DBD s DNA (dále jen DBD/DNA) lidského transkripčního faktoru FOXO4 na základě dat získaných metodou nukleární magnetické rezonance (NMR) spektroskopie, respektive rentgenové krystalografie.

Jako první byl v roce 2000 na základě NMR spektroskopické analýzy navržen model pro volnou FOXO4-DBD. Autoři potvrdili typickou *forkhead/winged helix* DBD zahrnující residua 102 až 176. N- a C- koncové části DBD vykazovaly typický chemický posun a nízkou míru resonance pozorovanou u neuspořádaných a značně flexibilních struktur, které proto nejsou součástí navrženého modelu¹¹².

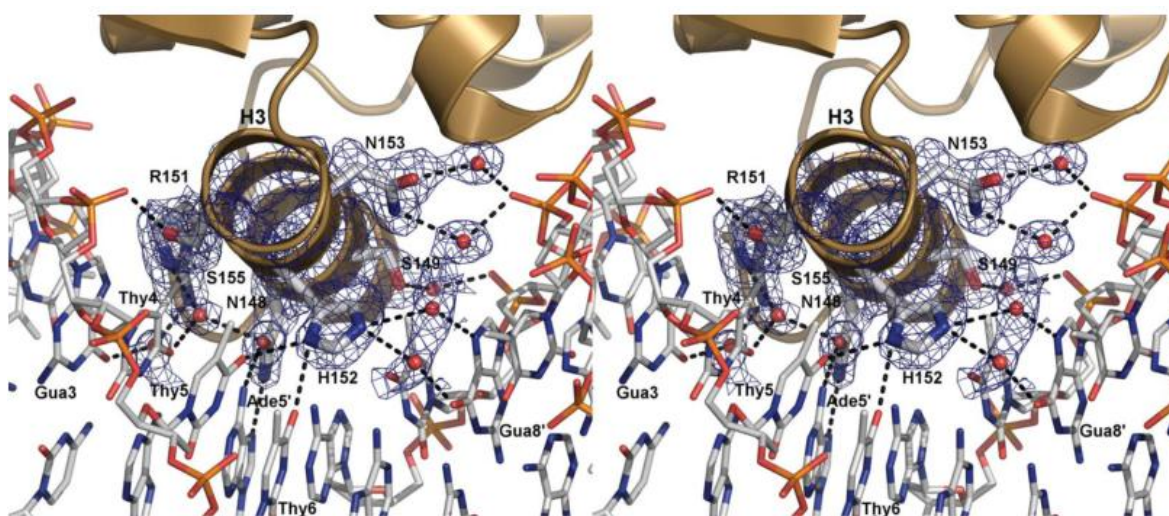


Obr. 12: Model struktury komplexu FOXO4-DBD/DNA. FOXO4-DBD zobrazena ve stužkové reprezentaci, dvoušroubovice DNA pak v tyčkové reprezentaci. Prvky sekundární struktury jsou označeny podle nomenklatury FOX proteinů rozebrané v textu. (a) Zobrazení podél osy šroubovice H3. (b) Zobrazení reprezentující situaci kdy osy dvoušroubovice DNA i šroubovice H3 jsou rovnoběžné s osou nákrasny. Převzato a upraveno z¹¹³.

Model pro strukturu komplexu FOXO4-DBD/DNA byl navržen v roce 2010 prof. Obšilem a kolektivem působícím na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze na základě rentgeno-krystalografické analýzy proteinového krystalu tvořeného komplexem DNA (13bp duplex, (5'-CTATGTAAACAAC-3', obsahující *FOXO consensus binding sequence* 5'-GTAAACAA-3') a FOXO4-DBD, zkrácené o smyčku W2 na C-konci (viz Obr. 12)¹¹³. Důvodem zkrácení byla flexibilita C-koncového regionu znemožňující úspěšnou krystalizaci. Postulovaný model komplexu odpovídal v základních rysech velmi dobře

ostatním dosud publikovaným modelům struktur FOXO-DBD či jejich komplexům s DNA.

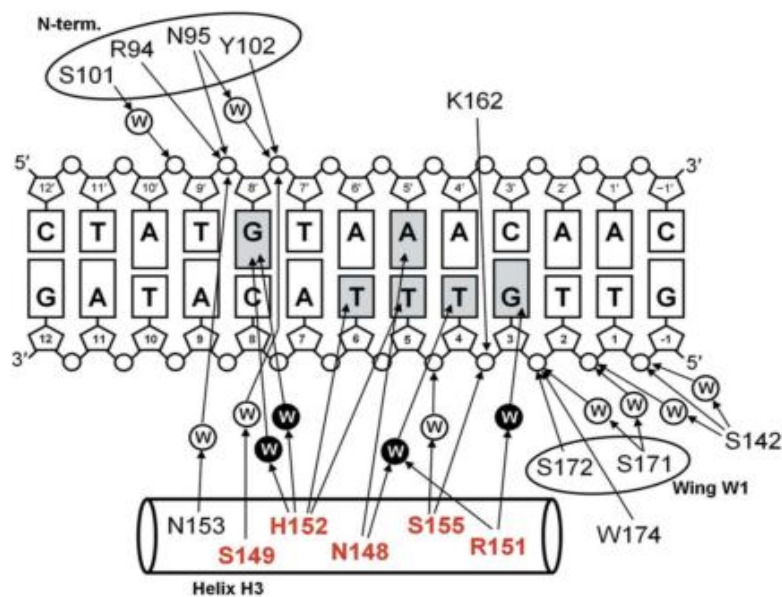
Struktura FOXO4-DBD je tvořena třemi α -šroubovicemi (H1 – H3), jednou 3_{10} -šroubovicí (H4) a trojřetězcovým β -skládaným listem (S1 – S3). Topologicky lze strukturu FOXO4-DBD vyjádřit jako H1-S1-H2-H4-H3-S2-W1-S3-W2. Všichni zástupci podrodiny FOXO se od zbytku FOX faktorů odlišují insercí pěti aminokyselin v oblasti mezi α -šroubovicemi H2 a H3 (K₁₃₇GDSN₁₄₁, číslování zbytků odpovídá FOXO4). Šroubovice H3 je zanořena do velkého žlábků DNA, přičemž osa α -šroubovice svírá téměř pravý úhel s osou dvoušroubovice DNA (viz Obr. 13).



Obr. 13: Stereoreprezentace interakce šroubovice H3 s velkým žlábkem dvoušroubovice DNA. Zobrazeno jádro rozpoznávané sekvence (5'-TAAACA-3'). Molekuly vody reprezentovány červenými body. Vodíkové vazby znázorněny přerušovanými čarami. U vybraných residuí a molekul vody zobrazena reprezentace elektronové hustoty. Převzato a upraveno z¹¹³.

Dále byly identifikovány regiony odpovědné za vazbu DNA: W1 smyčka mezi řetězci S2 a S3, očka mezi šroubovicemi H4 a H3 a N-koncová smyčka předcházející první šroubovici H1 (viz Obr. 14, str. 30).

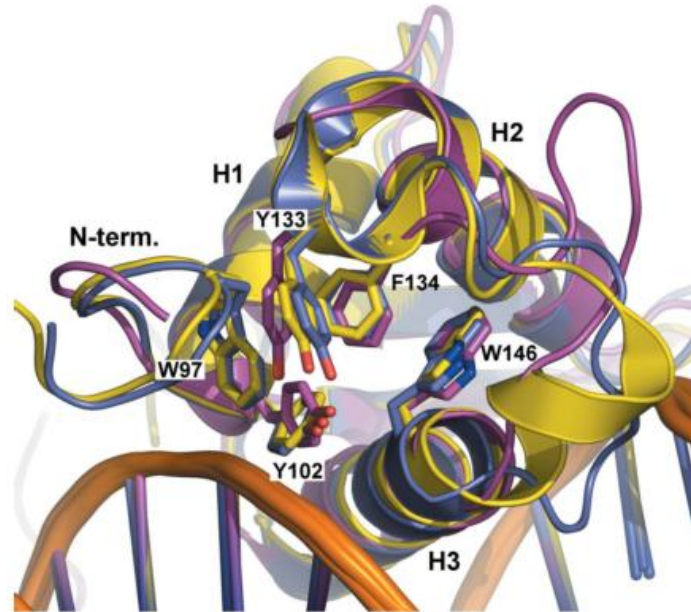
Na základě molekulárně dynamických simulací a FRET (z angl. *fluorescence resonance energy transfer*) analýzy byl jako jeden z DNA vázajících regionů identifikován i C-koncový W2. Právě tyto regiony vykazují mezi jednotlivými podrodinami faktorů FOX největší sekvenční variabilitu a předpokládá se, že mohou být zodpovědné za modulaci vazebné specificity. Rozhodně však svou interakcí s DNA přispívají ke zvýšení stability komplexu. Nejvyšší stupeň konzervace naopak vykazují α -šroubovice H1, H2 a H3¹¹⁴.



Obr. 14: Schematický diagram identifikovaných kontaktů mezi FOXO4-DBD a DNA. Residua a báze participující na specifických kontaktech zbarveny červeně, resp. šedě podbarveny. Převzato a upraveno z¹¹³.

Struktura domény je stabilizována hořečnatým iontem oktaedrálně koordinovaným C-koncovými zbytky H3 α -šroubovice. Šroubovice H3 tvoří několik přímých i vodou mediováných vodíkových vazeb s bázemi DNA. S fosfátovou kostrou interagují zbytky N-koncové části a smyčka W1. Vzhledem k zanedbatelným rozdílům v sekvenci H3 šroubovic mezi FOX proteiny se předpokládá, že sekvenční specifita DBD je dána mj. umístěním α -šroubovice H3 do velkého žlábků okolními regiony. V případě FOXO faktorů může být toto výsledkem kontaktů N-koncové části šroubovice H3 se smyčkou H2-H3 a N-koncovou částí DBD. U FOXO4 tyto regiony interagují skrze tvorbu klastru hydrofobních aminokyselin N-konce (Trp97, Tyr97), H2-H3 smyčky (Tyr133, Phe134) a α -šroubovice H3 (Trp146) (viz Obr. 15, str. 31).

Vedle přímého rozpoznávání bází DNA vyplynul z modelu struktury komplexu FOXO4-DBD/DNA další možný mechanismus založený identifikaci celkového tvaru dvoušroubovice DNA, která v pozorovaném komplexu vykazovala oproti kanonické B-formě ohyb 13° kolem α -šroubovice H3¹¹³. DNA sekvence bohaté na AT páry vykazují přirozeně signifikantní ohyb¹¹⁵. Stále zůstává otázkou, zda je pozorovaný ohyb DNA příčinou či důsledkem vazby.



Obr. 15: Klastř hydrofobních residuí na rozhraní mezi N-koncovým regionem , H2-H3 smyčkou a šroubovicí H3. FOXO3-DBD zbarvena fialově, FOXO1-DBD žlutě a FOXO4-DBD modře. Převzato a upraveno z¹¹³.

1.8 Metody studia struktury biologických makromolekul

1.8.1 Přístupy k řešení trojrozměrné struktury proteinů s vysokým rozlišením

První proteinová struktura (myoglobinu) byla vyřešena v roce 1958 pomocí rentgeno-strukturní analýzy proteinového krystalu¹¹⁶. Od té doby počet i rychlost, s jakou jsou nově vyřešené proteinové, struktury publikovány, neustále roste.

Rentgenová krystalografie je nejstarší a nejpopulárnější metoda umožňující získat informace o trojrozměrné struktuře proteinu s vysokým rozlišením. Tato metoda je založena na rozptylu rentgenového záření elektrony molekuly proteinu. Na rozdíl od viditelného záření nejsou v dnešní době technicky dostupné čočky fokusující rentgenové záření do obrazu reflektujícího příslušný vzor (proteinový krystal). Namísto toho je rozptýlené záření zaznamenáno jako difrakční obrazec, který je následnou Fourierovou transformací převeden na obraz proteinové struktury ve formě mapy elektronové hustoty. Difrakce odpovídající jedné molekule nese teoreticky veškerou informaci nutnou k vytvoření mapy elektronové hustoty, avšak prakticky je slabá a nedetekovatelná. Zesílení signálu je dosaženo užitím proteinových krystalů, což jsou trojrozměrné periodicky uspořádané pole prakticky stejně orientovaných proteinových molekul. Právě příprava

krystalů nemusí být v některých případech zcela triviální. Integrované membránové proteiny, velké makromolekulární komplexy, nestrukturované či multidomenové proteiny, až na výjimky nebo při použití speciálně navržených technik, prakticky nekrytalují. Nepřirozené interakce sousedních molekul v krystalu mohou způsobit, především u flexibilních částí, zaujetí nepřirozené konformace. Jejich struktura v krystalu se pak může lišit od struktury v roztoku^{117,118}. Přesto zůstává tato metoda absolutně nejužívanější, především z důvodu ultimátního rozlišení dosahujícího až na atomární úroveň (rozlišení 1.2Å a lepší)¹¹⁹.

Problém nutnosti přípravy proteinových krystalů a zkruslení struktury dané nepřirozenými kontakty molekul v krystalu byl překlenut v 80. letech minulého století zavedením techniky nukleární magnetické rezonance pro determinaci trojrozměrné struktury proteinů¹²⁰. Principem NMR spektroskopie je vystavení jader s nenulovým jaderným spinem (¹H, ¹³C, ¹⁵N) silnému magnetickému poli, přičemž jsou tato jádra excitována na vyšší energetickou hladinu rezonančním rádiofrekvenčním pulsem. Měřením následné deexcitace v časové doméně a jejím převedením do frekvenční domény pomocí Fourierovy transformace získáme NMR spektrum. Chemické okolí každého excitovaného jádra se odráží v jemném posunu rezonančního maxima. Tento tzv. chemický posun je pak nositelem strukturní informace¹²¹. NMR spektroskopie umožňuje analyzovat protein v roztoku, čímž je zachycena i flexibilita struktury. Částečně lze analyzovat i nesložené či částečně složené proteiny.

Pro detailní strukturní analýzu je zapotřebí připravit vícenásobně (¹³C, ¹⁵N, případně ¹H) značený protein, který navíc musí být dostatečně stabilní ve vysokých koncentracích a za podmínek kompatibilních s NMR analýzou. Tyto nároky jsou společně s maximální velikostí proteinu či komplexitou vzorku hlavními limitacemi. Abychom dostali odpověď o detailním uspořádání molekul či jejich částí a byli schopni jejich následného poskládání do multidomenové či multiproteinové struktury, je výhodné kombinovat vysoce rozlišující techniky s technikami s nižším rozlišením, které NMR a rentgenovou krystalografii doplňují a řadu jejich limitací obcházejí. V neposlední řadě je třeba zmínit i ekonomickou náročnost NMR experimentů plynoucí jak z drahé a na provoz náročné NMR instrumentace, tak z nákladnosti přípravy rekombinantních, izotopově značených proteinů¹²².

1.8.2 Přístupy k řešení trojrozměrné struktury proteinů s nízkým rozlišením

Na rozdíl od vysoce rozlišených struktur získávaných dvěma výše zmíněnými technikami je možné řešit strukturní uspořádání či interakce pomocí celé škály biofyzikálních technik s nízkým rozlišením. První takovou je kryoelektronová mikroskopie (cryoEM). Analogicky s klasickým světelným mikroskopem dochází u cryoEM k ozáření vzorku, v případě cryoEM svazkem elektronů. Rozptýlené záření je fokusováno soustavou magnetických čoček, což vede k vytvoření příslušného obrazu sledované částice vzorku, lépe řečeno 2D průmětu. Na rozdíl od rentgenostrukturní analýzy a NMR spektroskopie zdaleka neposkytuje data s tak vysokým rozlišením. Zásadní výhodou EM je možnost studovat strukturu velkých multiproteinových komplexů či celých buněčných organel s rozlišením 7 – 30 Å. Hlavním polem využití EM ve strukturní biologii je poskládání strukturně charakterizovaných podjednotek, jejichž struktura byla určena na základě technik s vysokým rozlišením, do modelu rozsáhlých multienzymových komplexů. Stejně jako u NMR je nevýhodou EM vysoká pořizovací cena instrumentů s kvalitní rozlišovací schopností¹²².

Technikou s nízkým rozlišením využitelnou ke studiu struktury je maloúhlový rozptyl rentgenového záření (z angl. *small angle X-ray scattering*). Tato metoda umožňuje zkoumat strukturu proteinů v roztoku. Strukturní informace je získána na základě elastického rozptylu rentgenových paprsků procházejících vzorkem jako záznam intenzity rozptýleného záření na rozptylovém úhlu. Výsledný záznam je charakteristický především pro velikost a celkový tvar proteinové molekuly¹²³.

Technikou vhodnou pro stanovení podjednotkového složení komplexů, odhadu velikosti a tvaru proteinů je analytická ultracentrifugace, která je založená analýze sedimentace částic¹²⁴. Ke studiu proteinové struktury a její dynamiky a interakcí proteinů bývají využívány i další techniky jako jsou izotermální titrační kalorimetrie, *micro-scale thermophoresis* či spektroskopie cirkulárního dichroismu. Rozbor těchto technik však přesahuje záběr této diplomové práce.

1.8.3 Metody studia struktury proteinů založené na hmotnostní spektrometrii

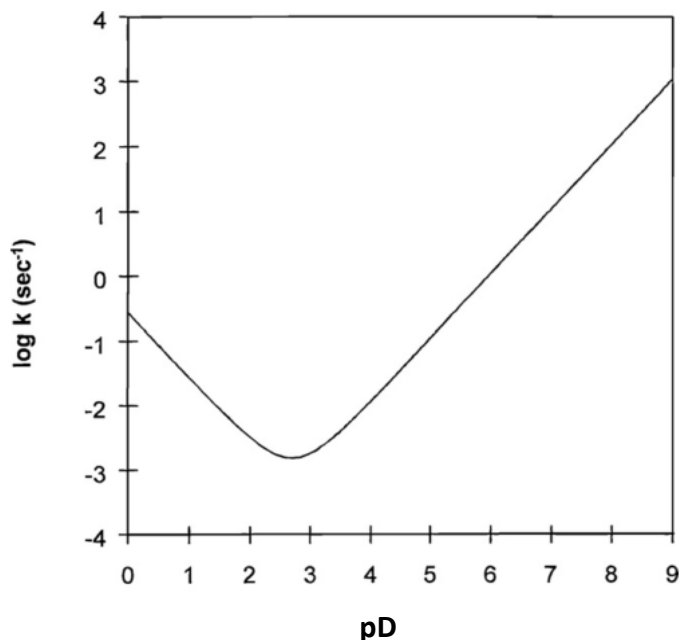
Mezi strukturní techniky s nízkým rozlišením, lze v dnešní době bezesporu zařadit metodiky založené na hmotnostní spektrometrii.

Prvním příkladem může být limitovaná proteolýza, která využívá různých proteolytických enzymů k odhalení přístupnosti proteinové struktury¹²⁵.

Základním principem dalších metod je provedení značení proteinu, které je závislé na struktuře proteinu a způsobuje změnu hmotnosti proteinu a je tedy detekovatelné hmotnostní spektrometrií. Těmito metodami jsou: vodík/deuteriová výměna a kovalentní značení včetně speciální metody tzv. chemického sítění.

1.8.4 Vodík/deuteriová výměna ve spojení s hmotnostně spektrometrickou analýzou

Metoda vodík/deuteriové výměny (HDX, z angl. *hydrogen/deuterium exchange*) vychází z poznatku, že vodíkové atomy vazeb O-H, N-H a S-H proteinů jsou vyměňovány za atomy vodíků okolního rozpouštědla. Výměna H→H není technicky detekovatelná. Vystavení proteinu těžké vodě (D₂O), vede k výměně H→D, která způsobí zvýšení hmoty proteinu o jednu hmotnostní jednotku za každou uskutečněnou výměnu. Předmětem studia HDX jsou díky optimálnímu časovému rozmezí výměny především vodíky amidické, které nalezneme u každého aminokyselinového zbytku s výjimkou prolinových a N-koncových.

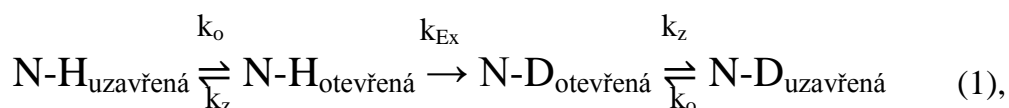


Obr. 16: Závislost dekadického logaritmu rychlostní konstanty výměnné reakce H→D (k) na pD. Převzato a upraveno z¹²⁶

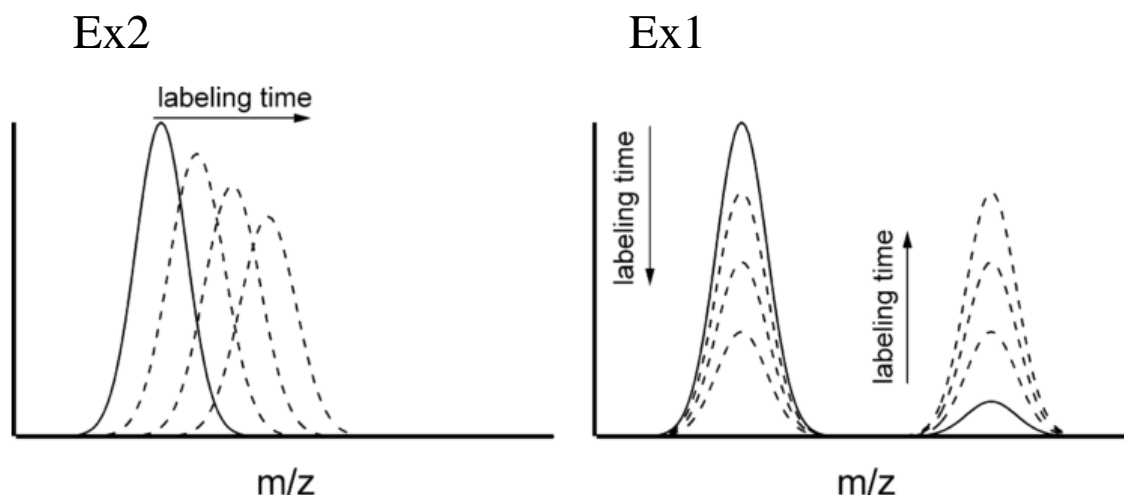
HDX je nejrychlejší pro kompletně solvatované regiony neparticipující na vodíkových vazbách. Rychlostní konstanta výměnné reakce H→D, k_{Ex} , je ovlivněna okolními

aminokyselinovými zbytky, teplotou pD (záporný dekadický logaritmus aktivity D⁺ iontů – obdoba pH pro deuterovaná rozpouštědla). Ze závislosti rychlostní konstanty výměny na pD (viz Obr. 16, str. 34) plyne, že k minimální výměně dochází při pD 2,5. Nad pD 4 dochází ke zvýšení k_{EX} o řád na každou jednotku pD.

Klíčem k využití HDX pro studium struktury proteinů je fakt, že míra a rychlost konverze N-H→N-D je modulována konformačním stavem proteinu. V uspořádaných regionech dochází k vytvoření mnoha intramolekulárních vodíkových vazeb. Zároveň bývá v těchto regionech omezen přístup solventu. I chráněné úseky však mohou vykazovat měřitelnou HDX. Takovéto výměny jsou zprostředkované přechody mezi tzv. otevřenými a uzavřenými konformacemi, způsobenými termálními pohyby. Populace sekvenčně identických proteinových molekul v roztoku není zdaleka homogenní, ale spíše odpovídá Gaussovské distribuci. Nejvíce zastoupená je za fyziologických podmínek nativní konformace odpovídající lokálnímu energetickému minimu. Ostatní, méně zastoupená a částečně rozbalená, species lze z termodynamického hlediska považovat za excitované stavy. Tyto opakující se pohyby bývají označovány jako „dýchání“. Celkový výměnný mechanismus může být v takovýchto případech vyjádřen rovnicí



kde k_o, k_z jsou rychlostní konstanty otevírání a zavírání. Rovnice (1) bývá diskutována pro dva krajní módy výměny nazvané Ex1 a Ex2. Pro Ex1 platí, že k_{EX} >> k_z. Je zřejmé, že v takovém případě dojde k výměně prakticky při prvním otevření těsné konformace, dalo by se říci při prvním „nadechnutí“ proteinu v D₂O. Pro Ex2 naopak platí, že k_{EX} << k_z. Při Ex2 dojde k výměně vodíku za deuterium během existence otevřené konformace jen s určitou malou pravděpodobností. V průběhu času dochází při Ex2 ke kontinuálnímu zvyšování průměrné hmoty v důsledku výměny H→D. Při Ex1 existují spíše dvě populace – nedeuterovaná a deuterovaná – mezi nimiž se v čase proporcionálně mění četnost výskytu (viz Obr. 17, str. 36). Za fyziologických podmínek bývá nejčastěji pozorován mechanismus odpovídající Ex2¹²⁶.

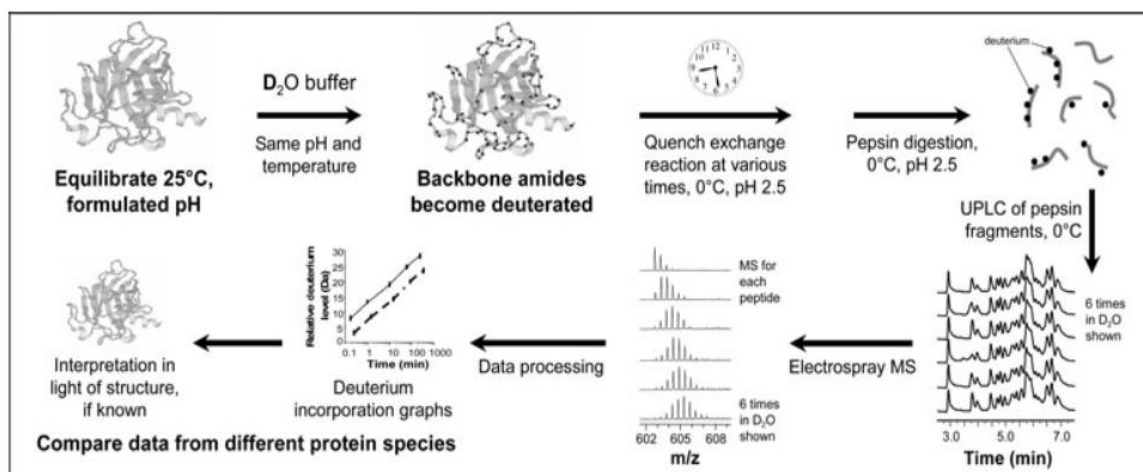


Obr. 17: Schematické znázornění závislosti deuteračního proteinu na době značení v D_2O pro dva rozdílné mechanismy vodíkové/deuteriové výměny: Ex1 (vpravo) a Ex2 (vlevo). Převzato a upraveno z¹²⁶

Metodu HDX byla nejprve využita ve spojení s technikou NMR. Novějším přístupem je spojení HDX s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS), které lze použít pro stanovení závislosti míry deuteračního proteinu na čase, po který byl protein vystaven D_2O . Informace získané těmito experimenty vypovídají o stabilitě a dynamice elementů sekundární struktury, spíše než o celkovém povrchu, který je přístupný rozpouštědлу.

Velmi důležitou aplikací metody HDX-MS je sledování protein-ligandových a protein-proteinových interakcí, ať již na úrovni celého proteinu či konkrétních regionů. Míra celkové deuteračního proteinu nese informaci o jeho interakcích, protože vazba partnera ovlivní termodynamickou stabilitu, konformaci nebo přístup rozpouštědla v určitých regionech. Pro identifikaci konkrétních regionů je využíván klasický hmotnostně spektrometrický přístup proteolytického štěpení následovaného LC-MS (z angl. *liquid chromatography – mass spectrometry*) analýzou v anglosaské literatuře známý jako *bottom-up*. Značení objektu v D_2O je v určených časových bodech ukončeno okyselením a ochlazením na $0^\circ C$, následovaným štěpením proteasou tolerující kyselé podmínky. Výsledná směs deuterovaných peptidů je odsolena a separována na HPLC koloně s reversní fází. Separované peptidy jsou podrobeny ESI-MS analýze. V HPLC systémech se běžně používají vodné fáze na bázi H_2O . K minimalizaci tzv. zpětné výměny ($D \rightarrow H$) u amidických vodíků, ke které by zde mohlo docházet, je nutné celý systém chladit na

teplotu 0°C, udržovat v něm pH 2,5 a veškeré operace provádět co možná nejrychleji. Výměnu na postranních řetězcích, ke které také dochází, nelze prakticky studovat, jelikož v obou směrech (H→D i D→H) je tak rychlá, že prakticky nelze zabránit zpětné výměně při HPLC separaci. Kyselé pH tolerující proteasy vykazují obecně malou specificitu a před samotnou analýzou HDX experimentu je nutné pro každý protein stanovit a optimalizovat množinu peptidů vznikajících za daných experimentálních podmínek. Peptidy jsou identifikovány MS/MS analýzou, při které je jednou z fragmentačních technik identifikován na základě známé aminokyselinové sekvence proteinu každý vzniklý peptid¹²⁷. Schematické znázornění reprezentativního experimentu je vyobrazeno na Obr. 18.



Obr. 18: Schéma znázorňující reprezentativní HDX-MS experiment. Objekt studie (protein, komplex protein-ligand, atd.) je vystaven pufru s D₂O, přičemž dochází k výměně amidických vodíků kostry za atomy deuteria. Výměnná reakce je v daných časových bodech ukončena okyselením na pH 2,5 a ochlazením na 0°C. Směs peptidů vzniklá následným štěpením pepsinem je odsolena a podrobena LC separaci při 0°C. Následuje ESI-MS analýza, zpracování výsledků a jejich interpretace. Převzato z¹⁴²

Relativní míra deuterace je u každého pozorovaného peptidu dána rovnicí

$$D(t) = \frac{m(t) - m_0}{m_{100} - m_0} \quad (2),$$

kde $m(t)$ je vážený průměr hmot piků izotopové obálky sledovaného peptidu v časovém bodě t , m_0 a m_{100} jsou hmoty odpovídající nedeuterované a plně deuterované formě peptidu a $D(t)$ je míra deuterace v časovém bodě t .

Úskalím interpretace HDX-MS dat je případ, kdy vazba partnera neindukuje změny v přístupnosti vodíkových můstků a je tak pro HDX částečně neviditelná¹²⁸.

Vedle studia interakcí vazebných partnerů lze HDX experimenty využít k mapování flexibilních regionů, které bývají vystaveny rozpouštědlu a nejsou zahrnuty v systému vodíkových vazeb sekundárních struktur. Identifikace takových regionů může přispět k návrhu lépe krystalujících konstruktů vhodných k rentgenostrukturní analýze poskytující strukturní data s vysokým rozlišením.

O překonání určitého hendikepu v podobě nízkého rozlišení HDX techniky, daného ne zcela ovlivnitelným nesespecifickým štěpením, se snaží zavedení nových disociačních technik (disociace přenosem elektronů, disociace záchytem elektronů), kdy fragmentace peptidových produktů v hmotnostním spektrometru dovoluje teoreticky dosáhnout až hraničního rozlišení, kdy je výměna přiřazena konkrétní amidové vazbě. Nové fragmentační techniky slibují zamezení efektu přeskokování vodíkových a deuteriových atomů v rámci peptidu, ke kterému docházelo při zahřátí peptidových iontů v plynné fázi kolizní aktivací¹²⁸.

1.8.5 Chemické sítě ve spojení s hmotnostně spektrometrickou analýzou

Chemické sítě ve spojení s hmotnostně spektrometrickou analýzou (z angl. *chemical cross-linking coupled with mass spectrometry*) aplikované na proteinech či proteinových komplexech je založeno na kovalentní modifikaci proteinu bifunkčním činidlem vedoucí ke spojení prostorově blízkých aminokyselinových zbytků a jejich následné identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie¹²⁹.

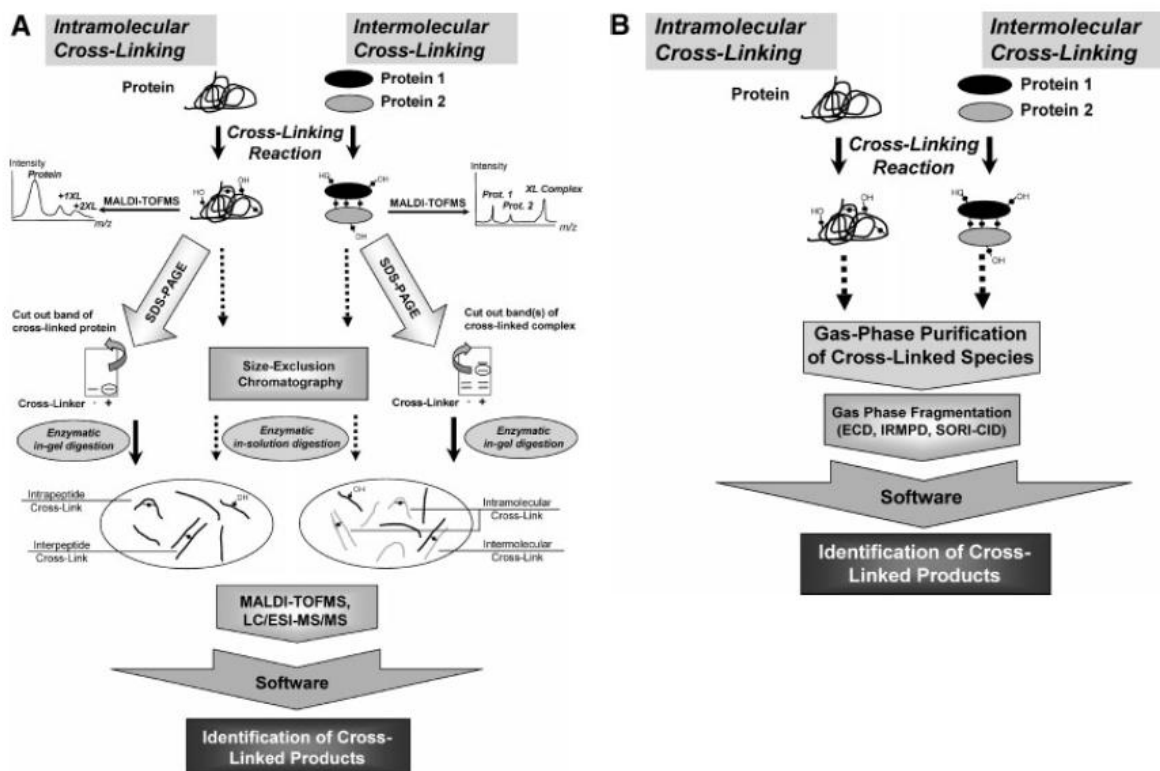
Síťovací činidlo sestává z alifatické spojky (z angl. *linker*) nesoucí na obou stranách dvě reaktivní funkční skupiny. Spojka definuje vzdálenost funkčních skupin a udává tím maximální možnou vzdálenost sítěním kovalentně spojených aminokyselinových zbytků. Reaktivní funkční skupiny, ať již u homobifunkčních (stejně reaktivní skupiny) či heterobifunkčních (rozdílné reaktivní skupiny) činidel, definují specifitu. K nejužívanějším patří amin-reaktivní činidla na bázi esterů N-hydroxylsukcinimidů. N-hydroxylsukcinimid reaguje přednostně s primárními aminy. Mezi jeho nevýhody patří nízká rozpustnost a nestabilita ve vodných rozpouštědlech. Dalšími často užívanými činidly jsou karbodiimidy. Karbodiimidová činidla neinkorporují spojku, ale přímo

kovalentně spojují velmi blízké ($< 3 \text{ \AA}$) aminokyselinové zbytky (karboxylové skupiny kyselých zbytků s aminoskupinami)¹³⁰.

Identifikace vzniklých sítění pomocí hmotnostní spektrometrie zahrnuje dva základní přístupy: *top-down* a *bottom-up* (viz Obr 19, str. 40).

Bottom-up přístup vychází ze specifického enzymatického štěpení výsledné reakční směsi po síťovací reakci a následné identifikaci sítění mezi vzniklými peptidy pomocí hmotnostní spektrometrie. Zásadní pro získání kvalitních výsledků je výběr proteasy s optimálním pokrytím sekvence. Vzhledem k nízkým výtěžkům síťovací reakce, kdy jen část reálných produktů odpovídá spojení dvou aminokyselinových zbytků, je třeba věnovat zvláštní pozornost optimalizaci reakčního času, pH pufru a v neposlední řadě koncentraci činidla. Po síťovací reakci následuje kontrolní jednorozměrná gelová elektroforéza části vzorku (SDS-PAGE, z angl. *sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*) a volitelná hmotnostně spektrometrická analýza technikou MALDI-ToF (z angl. *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*) pro ověření výtěžku reakce a možnou optimalizaci podmínek. V případě dostatečného výtěžku je možné přistoupit ke štěpení specifickou proteasou a to buď přímo v části vyříznutého polyakrylamidového gelu nebo v původní reakční směsi. Štěpení v roztoku poskytuje obvykle větší výtěžky. Výsledkem digesce je směs obsahující nemodifikované peptidy, peptidy modifikované částečně hydrolyzovaným činidlem (hydrolyza jedné reaktivní skupiny) nebo dvojice peptidů spojené síťovacím činidlem, popřípadě cyklický produkt vzniklý reakcí činidla s dvěma aminokyselinovými zbytky téhož peptidu. Takováto směs je analyzována technikami MALDI či ESI-MS. Vyhodnocení hmotnostně spektrometrických dat pak spočívá ve vytvoření souboru teoreticky vznikajících sítění, který je následně porovnán s experimentálními daty. Shodné záznamy jsou kriticky zhodnoceny pomocí kontrolních vzorků připravených bez síťovacích činidel. Identifikaci produktů chemického sítění napomáhá použití směsi izotopově značených činidel, typicky čtyřnásobně deuterovaného činidla v oblasti spojky a nedeuterovaného činidla. Výsledkem je výskyt duplicitních izotopových obálek lišících se o $4,025 u$ v hmotnostních spektrech. Nečastějšími problémy *bottom-up* přístupu jsou dlouhé vznikající peptidy kvůli častému přeskočení štěpného místa proteasou. K tomu dochází, protože nejčastěji užívaná činidla (N-hydroxysukcinimid a jeho deriváty) modifikují mj. lysinové zbytky a nejčastěji používaná proteasa - trypsin – obvykle štěpí mj. za lysinovými zbytky, neštěpí ty modifikované. Další limitací je

snížení nábojového stavu generovaného ionizačními technikami v důsledku ztráty pozitivního náboje modifikovaných aminoskupin. V případě komplexních vzorků, ve kterých se hmoty různých produktů síťovací reakce mohou často jen velmi málo lišit, je kladen zvýšený nárok na rozlišovací schopnost hmotnostně spektrometrického instrumentu¹³⁰.



Obr. 19: Hlavní strategie charakterizace proteinové struktury pomocí chemického sítění a hmotnostní spektrometrie. *Bottom-up* (A) a *top-down* (B) přístup. Popis v textu kap. 1.8.4. Převzato z¹³⁰.

Při *top-down* přístupu je intaktní sítěný protein či komplex proteinů přímo analyzován nejčastěji technikou ESI-FTICR (z angl. *electrospray ionization-Fourier-transform ion-cyclotron resonance*). Produkty chemického sítění jsou izolovány v ICR cele a následně fragmentovány řadou fragmentačních. Výhodou takového přístupu je možnost izolovat v plynné fázi jednu modifikovanou proteiny, u kterých je minimalizován vliv mnohačetných modifikací na strukturu. Nevýhodou *top-down* přístupu je poměrně drahá instrumentace a náročné vyhodnocení experimentálních dat¹²⁹.

V nedávné době se objevily snahy provádět chemické sítění proteinů *in vivo* přímo v živých buňkách a kovalentně tak spojit interagující proteiny v jejich nejpřirozenějším prostředí. Tento přístup může poskytnout unikátní pohled na organizaci buněčných procesů. Výhodou oproti běžným postupům je podchycení i velmi slabých a transienčních

interakcí, které jsou většinou ztraceny v průběhu purifikace před běžnými analytickými postupy. Doposud byly publikovány dvě principiálně rozdílné strategie *in vivo* chemického sítění. První využívá jako síťovací činidlo formaldehyd, který velmi dobře prostupuje buněčnou membránou do buňky¹³¹. Druhá strategie je založena na inkorporaci fotoaktivních chemikálií mimikujících přirozené aminokyseliny do zájmového proteinu proteosyntetickým aparátem buňky¹³².

Novým přístupem, který zásadně vylepšuje metodu sítění interagujících proteinových molekul síťovacím činidlem *in vivo* je tzv. metoda reportéru proteinové interakce (PIR, z angl. *protein interaction reporter*). Hlavním přínosem je vývoj nových síťovacích činidel (PIR) umožňujících snadnou identifikaci sítění v komplexním vzorku získaném po *in vivo* síťovací reakci. PIR síťovací činidlo obsahuje dvě labilní vazby, které je možné disociovat přímo v hmotnostním spektrometru. Disociací labilních vazeb dojde k rozdělení síťovacího činidla na tři fragmenty. Dva fragmenty jsou tvořeny vždy jedním z původně síťovaných peptidů a definovaným zbytkem činidla. Třetí fragment tvoří reportérová skupina. Přítomnost reportérové skupiny ve fragmentovém spektru slouží k jednoznačné identifikaci prekurzorového iontu jako produkt síťovací reakce. Ostatní ionty fragmentového spektra jsou dále podrobeny další fragmentační analýze nebo prohledány proti proteinové databázi s cílem identifikovat oba původně sítěné peptidy. Tento přístup umožňuje zásadní redukci analyzovaných dat, což zvyšuje rychlost analýzy a předurčuje tuto metodu pro rozsáhlé studium proteinové interakční sítě. Reportérová skupina může být zároveň vybavena afinitní skupinou (např. biotin), která umožňuje snížení komplexity vzorku afinitním nabohacením. Takto získaná data nesou kromě informace o interakci dvou proteinů i základní informaci o interagujících regionech^{133,134}.

1.8.5.1 Nativní hmotnostní spektrometrie a iontová mobilita

Nativní hmotnostní spektrometrie umožňuje zachovat kvartérní strukturu proteinových komplexů v průběhu hmotnostně spektrometrické analýzy a zkoumat tak jejich dynamiku a topologii podjednotek. Jako iontový zdroj je používána elektrosprejová ionizace (ESI, z angl. *electrospray ionization*). Místo obvyklé směsi kyselého vodného roztoku a organické fáze v poměru 1:1, který způsobuje částečnou denaturaci a rozbalení proteinů či rozpad kvartérní struktury v případě komplexů, jsou používány tzv. těžké pufrы (např. vodný roztok octanu amonného použitelný v koncentračním rozmezí od 5mM – 1M), které

na rozdíl od běžných pufrů užívaných ve strukturní biologii k navození nativních podmínek nenarušují proces ionizace. Během ionizačního procesu dochází k vytěknání amonium-acetátového pufru, který zanechá prakticky nesolvatovaný ion proteinu¹³⁵.

Principem experimentu je v iontovém zdroji získat ion nativního komplexu a stanovit nejprve sumární hmotnost komplexu. Následně je experiment zopakován, přičemž je proteinový komplex podroben různým disociačním podmínkám, při kterých může dojít k částečné až úplné disociaci podjednotek komplexu. Po disociaci jsou opět stanoveny hmoty rozpadových produktů. Ze získaných hmot podjednotek a komplexu je možné dovést jeho stechiometrii. Je známo, že periferní podjednotky disociují nejdříve. Hmoty rozpadových produktů při různých disociačních podmínkách nesou informaci o topologii podjednotek¹³⁶.

Technika iontové mobility je v podstatě variace nativní hmotnostní spektrometrie. Nativní ionty jsou separovány nejen na základě poměru m/z , ale také v iontově-mobilitní komoře vyplněné inertním plynem na základě kolizního průřezu. Kolizní průřez reprezentuje tvar a velikost molekuly. Iontová mobilita umožňuje separaci různých konformačních forem komplexů o stejné sumární hmotě, které se jen nepatrně liší svou strukturou. Přibývající množství dat ze stanovení kolizních průřezů u různých proteinových komplexů slibují jejich zahrnutí do algoritmů navržených pro modelování rozsáhlých proteinových komplexů, které dnes zdaleka neposkytují tak detailní modely jako obdobný přístup u menších proteinů^{128,135}.

2 Cíle práce

- Příprava proteinu a jeho komplexu s DNA
- Získání strukturních informací pomocí strukturních technik hmotnostní spektrometrie:
 - H/D výměna
 - Chemické sítě
- Sledování strukturních změn daných tvorbou komplexu

3 Materiál

3.1 Přístroje a pomůcky

Analytická kolona NiNTA	GE Healthcare, UK
Analytické váhy	Mettler Toledo, Švýcarsko
Automatické pipety	Eppendorf, SRN
	Gilson, USA
	Thermo Scientific, USA
Centrifuga 5415 Eppendorf	Eppendorf, SRN
Centrifuga Avanti J-26 XP	Beckman Coulter, USA
Centrifuga Spectrafuge 16M	Labnet, USA
Elektroforetická souprava	BioRad, USA
Fotodokumentační box G:Box HR16	Syngene, USA
HPLC Agilent 1200	Agilent technologies, SRN
HPLC BioSys 510	Beckam Coulter, USA
HPLC LC-20AD	Shimadzu, Japonsko
HPLC UltiMate 3000	Thermo Scientific, USA
Hmotnostní spektrometr Apex Qe Ultra 9,4T	Bruker Daltonics, SRN
Hmotnostní spektrometr solariX XR 12T	Bruker Daltonics, SRN
Chladnička	Zanussi, Itálie
Kolona Jupiter C18 (0,5 × 50 mm)	
částice o průměru 5 μm, velikosti pórů 300 Å	Phenomenex, USA
Kolona Acclaim PepMap 100 C18 (0,1 × 150 mm)	
částice o průměru 3 μm, velikosti pórů 100 Å	Thermo Scientific, USA
Kolona Acclaim PepMap 100 C18 (0,1 × 20 mm)	
částice o průměru 3 μm, velikosti pórů 100 Å	Thermo Scientific, USA

Mikrostříkačky	Hamilton, USA
NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris gel	Invitrogen, USA
Peptidová kolona MicroTrap	Bruker Daltonics, SRN
Proteinová kolona MicroTrap	Bruker Daltonics, SRN
pH elektroda Biotrode	Hamilton, Švýcarsko
pH metr Orion 2D star	Thermo Scientific, USA
pH metr φ200	Beckman, USA
Předvážky HF1200G	AND, USA
Sonikační lázeň	Bandellin, SRN
Spektrometr DeNovix DS-11	DeNovix, USA
Termostat Thermomixer comfort	Eppendorf, SRN
Třepačka Sanyo	Gallenkamp Ltd., UK
Třepačka VSR 23	Grant boekel, USA
Ultrazvuková sonda 4710	Cole-Pharmer, USA
Vialky se septem	Agilent, USA
Vodní lázeň	Memert, SRN
Vortex	Scientifica, Itálie
Zdroj deionizované vody	Milipore, USA
Zdroj napětí	BioRad, USA

3.2 Chemikálie

1,2-bis(dimethylamino)-ethan (TEMED)	Sigma-Aldrich, SRN
(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin) ethansulfonová kyselina (HEPES)	Sigma-Aldrich, SRN
1,4-dithithreitol	Fluka, Švýcarsko
Acetonitril	Merck, SRN
Agar	Oxoid, USA
Akrylamid	Sigma-Aldrich, SRN
Ampicilin	Jersey Lab Supply, USA

Arginin	Sigma-Aldrich, SRN
APCI-L Low Concentration Tuning Mix	Agilent Technologies, USA
Bacto-Trypton	Oxoid, USA
Bacto-Yeast extrakt	Oxoid, USA
Bromfenolová modř	Serva, SRN
Comassie Brilliant Blue R 250	Sigma-Aldrich, USA
Deuterium oxid	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid	Merck, SRN
Disukcinimidyl glutarát	Thermo Scientific, USA
Disukcinimidyl glutarát 4× deuterovaný	Thermo Scientific, USA
Disukcinimidyl suberát	Thermo Scientific, USA
Disukcinimidyl suberát 4× deuterovaný	Thermo Scientific, USA
Ethanol	Merck, SRN
Fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, SRN
Glukosa	Lach-Ner, ČR
Glycin	Sigma-Aldrich, SRN
Hydroxid sodný	Lachema, ČR
Chlorid sodný	Sigma-Aldrich, USA
Imidazol	Fluka, Švýcarsko
Kyselina chlorovodíková	Lachema, ČR
Kyselina mravenčí	Fluka, Švýcarsko
Kyselina octová	Fluka, Švýcarsko
Leupeptin	Sigma-Aldrich, SRN
Methanol	Lach-Ner, ČR
Methanol (LCMS)	Merck, SRN
N,N-methylen-bis-akrylamid	Sigma-Aldrich, SRN
Novex Sharp Prestained Protein Standard	thermo Scientific, USA
NuPAGE LDS vzorkový pufr	Invitrogen, USA
NuPAGE MES SDS 20× koncentrovaný pufr	Invitrogen, USA

Prestained Protein Marker	New England Biolabs, USA
Sacharosa	Lachema, ČR
Sušené mléko	PML, ČR
SeeBlue Pre-stained Protein Standard	Life Technologies, USA
Tris	Sigma-Aldrich, SRN
Unstained Protein MW Marker	Thermo Scientific, USA
Voda (LCMS)	Merck, SRN

3.3 Enzymy

DNasa I	Sigma-Aldrich, USA
Lysozym	Sigma-Aldrich, USA
Nepenthesin 1	připraven v naší laboratoři
Pepsin	Sigma-Aldrich, USA
RNasa A	Sigma-Aldrich, USA
Trypsin	Promega, USA

3.4 Bakteriální kmeny

<i>Epicurian Coli</i> BL21-Gold (DE3)	Stratagene, USA
genotyp: F ⁻ ompT hsdS(rB – mB –) dcm ⁺ Tetr gal λ(DE3) endA Hte	

3.5 Vektory a oligonukleotidy

pET_15b_FOXO4-DBD	V. Obšilová, FGÚ AV ČR
KV_f (5'-TTG GGT AAA CAA G-3')	IDT, USA
KV_r (5'-CTT GTT TAC CCA A-3')	IDT, USA

3.6 Roztoky a média

Akrylamidová směs pro SDS-PAGE (30%)

70 % (v/v) H₂O, 29 % (w/v) akrylamidu, 1 % (w/v) N,N-methylen-bis-akrylamidu

Barvicí roztok Coomassie brilliant blue pro SDS-PAGE

45 % (v/v) methanolu, 44,75 % (v/v) H₂O, 10 % (v/v) kyseliny octové, 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250

Blokovací pufr pro elektropřenos

30 mg/ml sušeného mléka v TBST pufru

Imidazolový pufr pro afinitní purifikaci

500mM NaCl, 20mM fosfát sodný, 600mM imidazol, pH 7,4, přefiltrováno, odvzdušněno

LB médium

1% (w/v) Bacto-tryptonu, 0,5% (w/v) Bacto-yeast extraktu, 1% (w/v) NaCl, pH 7,4, sterilizováno

LB agar

LB médium s 1,8% (w/v) agarem

Mobilní fáze pro LC-MS analýzu

Fáze A – 0,1% kyselina mravenčí a 2% acetonitril ve vodě

Fáze B – 0,1% kyselina mravenčí v 98% acetonitrilu

Mobilní fáze pro H/D LC-MS(/MS) analýzu

Fáze A – 2% acetonitril a 4% kyselina mravenčí ve vodě

Fáze B – 4% kyselina mravenčí v 95% acetonitrilu

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE

55 % (v/v) H₂O, 35 % (v/v) ethanolu, 10 % (v/v) kyseliny octové

Promývací pufr pro afinitní purifikaci

500mM NaCl, 20mM fosfát sodný, 50mM imidazol, pH 7,4, přefiltrováno, odvzdušněno

Pufr pro gelovou filtraci (HEPES pufr)

10mM HEPES, 50mM NaCl, pH 7,4

Roztok luminolu

10% (v/v) 1 M Tris-HCl, 1% (v/v) luminol 0,45% (v/v) kyselina kumarová, pH 8,5

Roztok NiCl₂

10 mg mL⁻¹ NiCl₂ v H₂O; přefiltrováno, odvzdušněno

Roztok peroxidu vodíku

10% (v/v) 1M Tris-HCl, 0,06% (v/v) peroxid vodíku, pH 8,5

Roztok protilátky pro imunodetekci

1:4000 (v/v) Monoklonální Anti-polyHistidinová protilátka konjugovaná s peroxidasou v TBST pufru

Sacharosový pufr

50mM Tris-HCl, 25% (w/v) sacharosa, 1mM PMSF, 1 μM leupeptin, pH 7,4

SDS pufr

10mM Tris-HCl, 250mM glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3

TBS pufr

1,4M NaCl, 200mM Tris-HCl, pH 7,6

TBST pufr

10% (v/v) TBS pufru, 1% (v/v) Tween 20

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE, redukující

100mM DTT, 50mM Tris-HCl, 12% (v/v) glycerol, 4% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) bromfenolová modř, pH 6,8

3.7 Software

Data Analysis 4.1

Bruker Daltonics, SRN

DeutEx

D. Kavan, P. Man, ČR

XLynx

M. Young, USA

Mascot 2.2

Matrix Science, UK

PyMol 1.7.6

Schrödinger LLC, USA

4 Metody

4.1 Příprava DNA vazebné domény transkripčního faktoru FOXO4

4.1.1 Transformace kompetentních buněk vektorem pET_15b_FOXO4-DBD

Kompetentní buňky produkčního kmene *Epicurian Coli* uchovávané v mrazicím boxu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ byly ponechány roztát na vodní lázni s ledem při $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Půl mikrolitru zásobního roztoku plasmidu (pET-15b_FOXO4-DBD, $c = 250\text{ ng}/\mu\text{l}$) vytemperovaného na $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ bylo přidáno ke $200\text{ }\mu\text{l}$ buněčné suspenze. Následovala společná inkubace 15 min a tepelný šok provedený ponořením mikrozkuhavky na 45 sekund do vodní lázně o teplotě $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po pětiminutové inkubaci na ledu byl přidán 1 ml sterilního LB média vytemperovaného na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Směs byla inkubována 1 h při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Buněčná suspenze byla po inkubaci centrifugována 3 min při $6000 \times g$. Polovina supernatantu byla odstraněna a ve zbylém supernatantu byla resuspendována bakteriální peleta. Následně bylo $30\text{ }\mu\text{l}$ zakoncentrované buněčné suspenze přeneseno na Petriho misku s LB Amp agarem (koncentrace ampicilinu $100\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$), kde byla rovnoměrně rozetřena bakteriologickou kličkou. Petriho miska byla inkubována 12 až 16 hodin při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.2 Test produkce proteinu FOXO4-DBD

Jedním mililitrem sterilního LB s Amp (koncentrace ampicilinu $100\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$) bylo zaočkováno jednou kolonií transformovaných kompetentních buněk (viz kap. 4.1.1). Kultury byly třepány při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ rychlostí 250 ot./min 12 až 16 hodin. Z každé noční kultury byly $10\text{ }\mu\text{l}$ buněčné suspenze zaočkovány dvě zkuhavky s LB médiem s Amp (1 ml , koncentrace ampicilinu $100\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$) a inkubovány 2,5 h při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ za třepání rychlostí 250 ot./min . Zbylá noční kultura byla centrifugována 3 min při $6000 \times g$ a peleta byla zmrazena na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Do jedné z dvojice zkuhavek bylo přidáno $5\text{ }\mu\text{l}$ zásobního 100 mM roztoku izopropyl- β -D-galaktopyranosidu (IPTG) tak, že výsledná koncentrace činila $0,5\text{ mM}$. Buněčné kultury byly dále za stejných podmínek inkubovány 3 h. Ze všech zkuhavek bylo odebráno $100\text{ }\mu\text{l}$ buněčné suspenze a centrifugováno 3 min při $6\ 000 \times g$. Pelety byly resuspendovány ve $20\text{ }\mu\text{l}$ vzorkovém pufru se 100 mM DTT a povařeny pět

minut. Takto připravené vzorky byly analyzovány elektroforézou v polyakrylamidovém gelu.

4.1.3 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Při elektroforéze v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) byl použit 15% polyakrylamidový separační a 5% zaostřovací gel. Gely byly připraveny dle Tab. 1.

Tab. 1: Složení separačního a zaostřovacího gelu pro polyakrylamidovou elektroforézu v prostředí dodecylsulfátu sodného

	15% separační polyakrylamidový gel (5 ml)	5% zaostřovací polyakrylamidový gel (1 ml)
H ₂ O	1,1	0,68
30% akrylamidový mix	2,5	0,17
1,5M Tris (pH 8,8)	1,3	–
1,0M Tris (pH 6,8)	–	0,13
10% dodecylsulfát sodný (SDS)	0,05	0,01
10% peroxodisíran amonný (APS)	0,05	0,01
tetramethylethyldiamin (TEMED)	0,002	0,001

Do jamek v gelu bylo naneseno 5 µl proteinového standardu (*unstained protein marker* nebo *prestained protein marker*) a dále po 20 µl vzorků. Ty byly připraveny 5 min povařením v redukujícím vzorkovém pufru. Elektroforetická separace probíhala 40 – 50 min při 25 mA na každý polyakrylamidový gel o rozměru 8,5 × 7,5 × 0,1 cm. Vizualizace separovaných proteinů byla provedena obarvením barvicím roztokem Coomasie Brilliant Blue po dobu 20 min. Nespecificky obarvené pozadí bylo odbarveno odbarvovacím roztokem.

4.1.4 Elektropřenos proteinů s následnou imunodetekcí

Na anodovou desku aparatury pro elektropřenos byla umístěna plastová maska s výřezem 8,5 × 7,5 cm, dále 6 vrstev filtračního papíru o rozměru 9 × 8 cm, nitrocelulosová (NC) membrána o rozměru 8,5 × 7,5 cm, polyakrylamidový gel po elektroforetické separaci

a opět 6 vrstev filtračního papíru. Filtrační papíry, NC membrána i polyakrylamidový gel byly předem máčeny 10 min v TBS pufru. Byl kladen zvláštní důraz na to, aby jednotlivé vrstvy zcela přiléhaly bez viditelných vzduchových bublin, které by mohly bránit efektivnímu elektropřenosu. Po přiklopení celé soustavy katodovou deskou byl zahájen přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na NC membránu probíhající 100 min při napětí $0,8 \text{ mA/cm}^2$. Následně byla membrána blokována blokovacím pufrům po dobu 90 min a poté třikrát 5 min omývána TBST pufrům. Blokována membrána byla inkubována v roztoku protilátky 14 hodin při $4 \text{ }^\circ\text{C}$ a třikrát 5 min omývána TBST pufrům. Membrána zbavená přebytečného TBST pufru byla na 30 s zcela pokryta ECL roztokem (směs roztoku luminolu a peroxidu vodíku v poměru 1 : 1). Poté byl ECL roztok odstraněn a luminiscenční signál byl vyfotografován ve fotodokumentačním boxu G:Box HR16.

4.1.5 Velkoobjemová produkce proteinu FOXO4-DBD

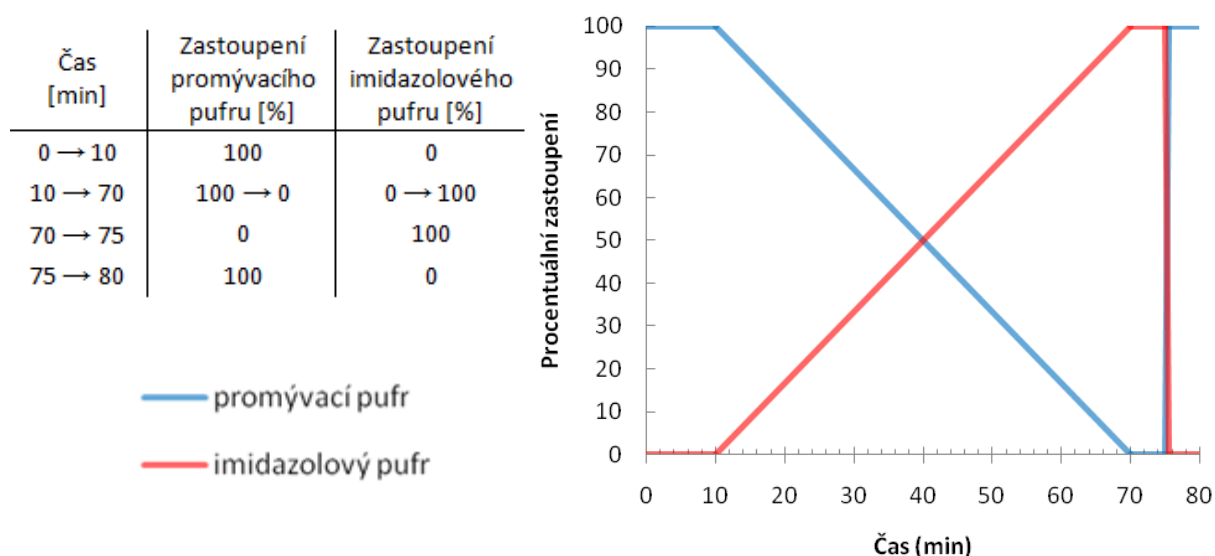
Sterilní LB s Amp (2 ml, koncentrace ampicilinu $100 \text{ } \mu\text{g/ml}$) bylo zaočkováno částí pelety z noční kultury transformované plasmidem pET_15b_FOXO4-DBD uchovávané při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Po následné inkubaci 12 až 16 hodin při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ byl jedním mililitrem nově připravené noční kultury zaočkován 1 l LB média s Amp (koncentrace ampicilinu $100 \text{ } \mu\text{g/ml}$). Buněčná suspenze byla třepána 3 až 4 hodiny při 37°C rychlostí 220 ot./min . Když buněčná suspenze dosáhla optické denzity v rozmezí 0,5 až 0,7 (měřeno při vlnové délce 600 nm - OD_{600}) byla kultura ochlazená na $30 \text{ }^\circ\text{C}$ a exprese proteinu byla indukována přidávkem 5 ml zásobního 100mM roztoku IPTG tak, že výsledná koncentrace činila $0,5 \text{ mM}$. Produkce proteinu probíhala 12 h při $30 \text{ }^\circ\text{C}$ za třepání rychlostí 220 ot./min .

4.1.6 Izolace proteinu z produkční kultury

Produkční kultura (1 l) byla 10 min centrifugována při $6000 \times g$. Bakteriální peleta byla převrstvena 20 ml sacharosového pufru, který byl následně opatrně slit. Opláchnutá peleta byla resuspendována ve 20 ml sacharosového pufru doplněného o lysozym ($5 \text{ } \mu\text{g/ml}$), DNasu I (300 U), RNasu A (300 U) a MgCl_2 (20 mM). Suspenze ve vodní lázni s ledem byla lyzována třiceti sonikačními cykly – 30 s sonikace následovaná 30 s chlazením v lázni. Buněčný lyzát byl centrifugován 70 min při $40\,000 \times g$, přičemž peleta byla odstraněna.

4.1.7 Afinitní purifikace niklovou chelatační chromatografií

Buněčný lyzát (přibližně 25 ml) byl filtrován přes běžný filtrační papír a nanesen na analytickou kolonu NiNTA (kolona byla nabitá roztokem Ni^{2+} iontů), která byla předtím 30 minut promývána promývacím pufrém. Průtok po celou dobu nanášení vzorku i analýzy činil 1 ml/min. Po nanášení proteinu byla spuštěna automatická metoda zahrnující oplach kolony promývacím pufrém, eluci navázaných proteinů imidazolovým pufrém i následné promytí kolony. Složení mobilní fáze v průběhu automatické metody je shrnuto v Grafu 1. V průběhu eluce (10. až 70. min) byly sbírány frakce po 1 ml. U jednotlivých frakcí byla spektrofotometricky na přístroji DS-11 na základě znalosti teoretického molárního extinkčního koeficientu ($\epsilon_{280} = 31\,970 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) stanovena koncentrace proteinu při 280 nm a 10 μl bylo analyzováno SDS-PAGE dle postupu popsaném v kap. 4.1.3. Vybrané frakce byly následně spojeny a zkoncentrovány na výsledný objem 900 μl centrifugační filtrací přes membránu s limitem průchodu 3 000 Da.



Graf 1: Složení mobilní fáze v průběhu niklové chelatační chromatografie doplněný o shrnující tabulku složení mobilní fáze.

4.1.8 Odštěpení polyhistidinové kotvy

K roztoku proteinu v imidazolovém pufru pro niklovou chelatační chromatografií bylo přidáno takové množství zásobního roztoku trombinu (1000 U/ml), aby výsledný obsah proteasy činil 1 U/mg proteinu. Štěpení probíhalo 14 hodin při 4 °C.

4.1.9 Gelová permeační chromatografie

Na kolonu Superdex 75 ekvilibrovanou 30 min mobilní fází (HEPES pufr o složení 10mM HEPES, 50mM NaCl, pH 7,4) při průtoku 0,5 ml/min bylo nastříknuto 900 μ l roztoku reakční směsi ze štěpení trombinem (viz kap. 4.1.8). Průtok mobilní fáze byl po celých 60 min separace udržován na 0,5 ml/min. Frakce po 0,6 ml byly jímány v případě, že absorbance roztoku vytékajícího z kolony při 280 nm překročila hodnotu 0,100. U jednotlivých frakcí byla spektrofotometricky na přístroji DS-11 na základě znalosti teoretického molárního extinkčního koeficientu ($\epsilon_{280} = 31\,970\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) stanovena koncentrace proteinu při 280 nm a 10 μ l bylo analyzováno SDS-PAGE dle postupu popsaném v kap. 4.1.3. Jednotlivé proteinové frakce s odštěpenou polyhistidinovou kotvou byly až do dalšího zpracování uchovávány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.10 Hmotnostně spektrometrická charakterizace produktů přípravy proteinu FOXO4-DBD

Vzorek proteinu přečištěného gelovou permeační chromatografií (viz kap. 4.1.9) obsahující 20 μ g proteinu byl vyředen 0,5% roztokem kyseliny mravenčí (FA, z angl. *formic acid*) na celkový objem 250 μ l. Mikrokolona s obrácenou fází (Protein MicroTrap, Bruker Daltonics) byla dvakrát promyta 250 μ l 50% acetonitrilu (ACN) a jednou 250 μ l 80% ACN. Ekvilibrace kolony proběhla trojnásobným promytím 250 μ l 0,5% FA. Následně bylo na kolonu nanášeno 250 μ l vzorku. Proteiny zachycené na koloně byly odsoleny trojnásobným promytím kolony 250 μ l 0,5% FA. Eluce odsolených proteinů z kolony byla provedena 50 μ l roztoku 0,5% FA v 80% ACN. Eluovaný roztok odsoleného proteinu byl doplněn 0,5% FA na celkový objem 100 μ l. Tento roztok byl nastříknut přímo do ESI iontového zdroje (Bruker Daltonics) spojeného s FTICR hmotnostním spektrometrem solariX XR (Bruker Daltonics). Hmotnostně spektrometrická analýza probíhala v pozitivním módu s akvizicí 2 miliony datových bodů. Hmotnostní spektrum bylo stanoveno v rozsahu poměrů m/z od 150 do 2500.

4.2 Vodík/deuteriová výměna

4.2.1 Příprava dvoušroubovice DNA

Dvoušroubovice DNA byla připravena smícháním 11,7 μl přímého oligonukleotidu KV_f, 10 μl zpětného oligonukleotidu KV_r a 8,3 μl dH_2O . Směs oligonukleotidů byla zahřáta na 95 °C 1 min a ponechána zchladnout při 20 °C.

4.2.2 Příprava deuteriem značených vzorků

Před samotným značením byly vytvořeny zásobní roztoky FOXO4-DBD a FOXO4-DBD/DNA odměřením 46,1 μl roztoku proteinu (21,7 μM) v HEPES pufru viz kap. 4.1.9. Komplex byl připraven přidáním 1,46 μl roztoku dvoušroubovice DNA (675 μM) připraveného dle kap. 4.2.1. Oba zásobní roztoky byly doplněny puftrem použitým při gelové chromatografii na celkový objem 50 μl a ponechány 30 min při 20 °C.

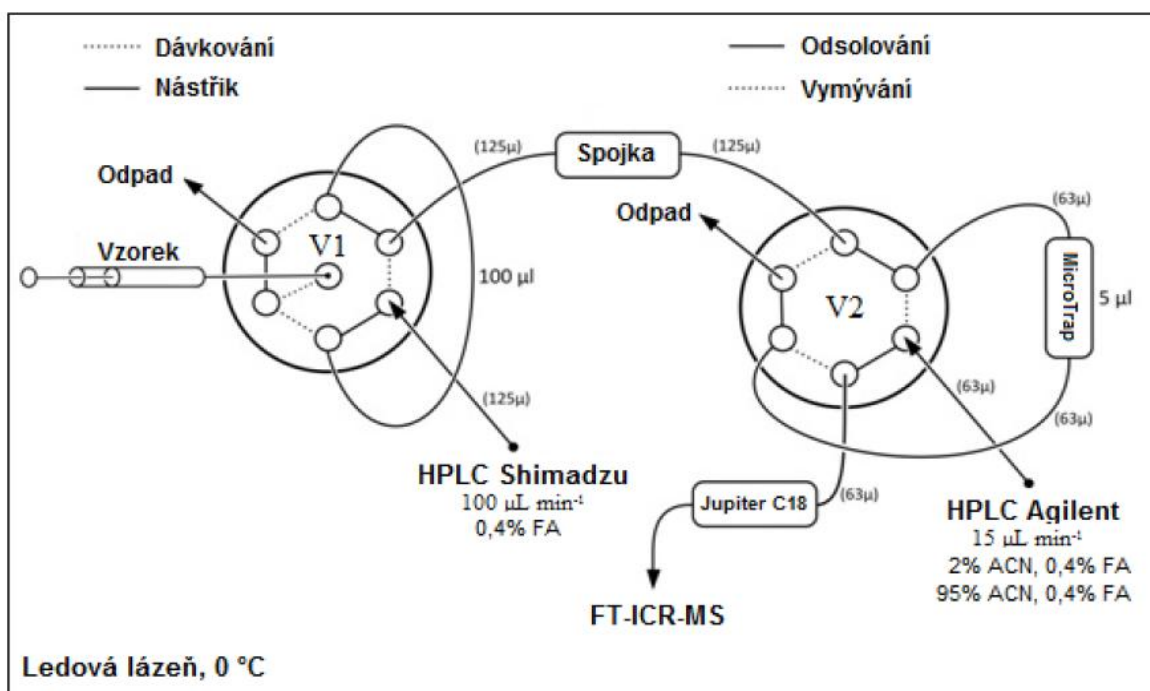
Vodík/deuteriová výměna započala smísením zásobního roztoku se 450 μl D_2O pufru a probíhala tak při 2 μM koncentraci FOXO4-DBD. Poměr FOXO4-DBD k DNA se rovnal 1 : 1. V přesně daných časových bodech (20 s, 2 min, 5 min, 10 min, 30 min, 60 min, 180 min a 300 min) bylo z reakční směsi odebráno 50 μl (odpovídá 100 pmol FOXO4-DBD), které byly neprodleně smíseny s 50 μl glycinového pufru (1M, pH 2,35) a zmrazeny vhozením do kapalného dusíku. Snížením pH vzorku na 2,5 a hlubokým zmrazením došlo k zastavení procesu vodík/deuteriové výměny. Vzorky byly až analýzy uchovávány při – 80 °C.

4.2.3 LC-MS/MS analýza produktů štěpení a jeho optimalizace

V rámci optimalizace proteolytického štěpení byly vyzkoušeny celkem tři možnosti týkající se proteolytických kolon: kolona s imobilizovaným pepsinem, nepenthesinem 1 nebo kombinace obou kolon v pořadí pepsin – nepenthesin 1. Vzorek byl připraven odměřením 18,6 μl roztoku FOXO4-DBD (21,7 μM) a doplněním glycinovým puftrem (1M, pH 2,35) na výsledný objem 100 μl . Takto připravený vzorek obsahoval 400 pmol proteinu.

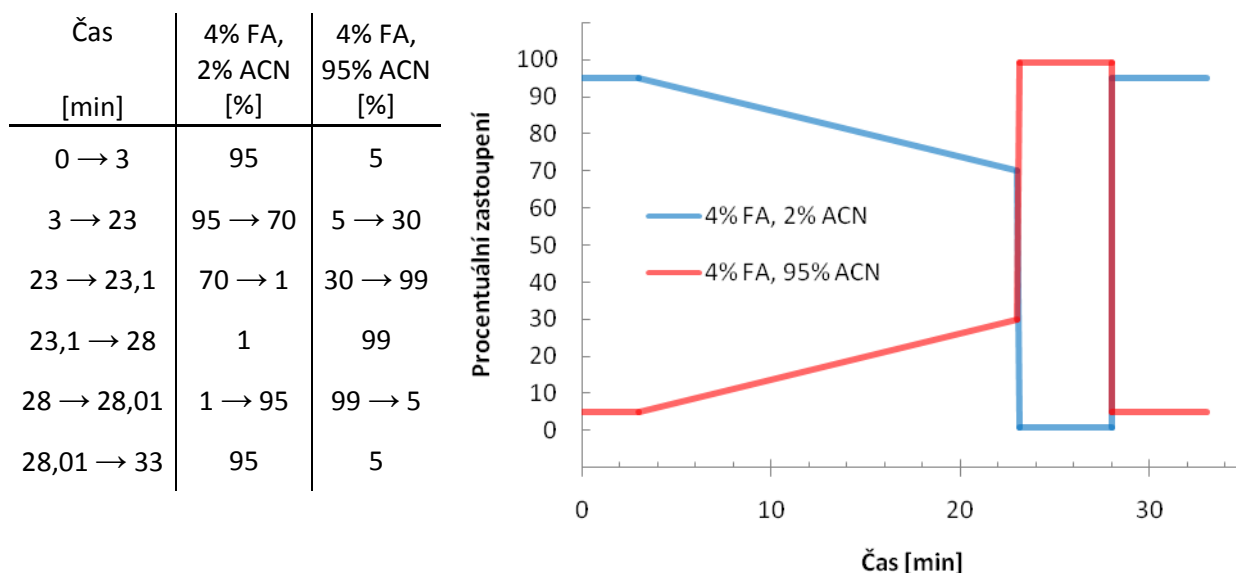
Kapalinově chromatografická analýza předcházející MS/MS analýze byla provedena na LC systému složeném ze tří typů kolon (proteolytická, předkolona a analytická kolona

s reverzní fází), dvou HPLC pump (Shimadzu LC-20AD, průtok 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ a Agilent 1200, průtok 15 $\mu\text{l}/\text{min}$) a dvou dvoucestných ventilů (viz Obr. 13, str. 55). Celý systém byl chlazen vodní lázní s ledem na teplotu 0 °C. Analýza započala (v čase 0) dávkováním vzorku nástřikovým ventilem (V1 v Obr. 13, str. 55) do nástřikové smyčky o objemu 100 μl , ze které byl průtokem 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ 0,4% kyseliny mravenčí nastříknut na proteasovou kolonu, popřípadě kombinaci proteasových kolon, kde došlo působením imobilizovaných proteas ke štěpení vzorku. Vzniklé peptidy byly zakoncentrovány a odsoleny na peptidové koloně MicroTrap. Přepnutím (v čase 3 min) přepínacího ventilu (V2 v Obr. 13, str. 55) do procesu vymývání byla na kolonu MicroTrap přivedena mobilní fáze z HPLC pumpy Agilent 1200 o průtoku 15 $\mu\text{l}/\text{min}$. Gradientem ACN v mobilní fázi došlo k vyplavení peptidů z peptidové kolony a jejich následné separaci na analytické koloně s obrácenou fází Jupiter C18. Složení mobilních fází a průběh gradientu je shrnuto v Grafu 2 na str. 56 a přidružené tabulce. Separované peptidy byly dále analyzovány MS/MS analýzou v hmotnostním spektrometru Apex Ultra Qe Bruker Daltonics konstrukčně založeném na iontově cyklotronové rezonanční cele s Fourierovou transformací (FTICR) v magnetickém poli 9,4 T.



Obr. 20: Schéma LC systému použitého pro štěpení deuteriem značených vzorků a následné odsolení a separaci vzniklých peptidů. Nástřikový ventil označen V1, přepínací ventil V2. FA = kyselina mravenčí, ACN = acetonitril. Dále vyznačeny peptidová kolona MicroTrap a analytická kolona s reverzní fází Jupiter C18. Převzato od Mgr. Alana Kádka.

Ionizace byla provedena technikou elektrospreje (ESI). Měření probíhalo v pozitivním módu s akvizicí 1 milion datových bodů. Před analýzou byl hmotnostní spektrometr kalibrován standardem argininových klastrů. Hmotnostní spektrum bylo stanoveno v rozmezí poměru m/z od 300 do 1 800. MS/MS analýza probíhala v datově závislém módu, kdy ion určený ke kolizní fragmentaci v hmotnostním spektrometru byl vybrán na základě intenzity jeho signálu. Z každého skenu bylo pro fragmentaci vybráno šest nejintenzivnějších prekurzorových iontů. Výsledná data byla vyhodnocena programem Mascot 2.2, který prohledáním proti proteinové databázi obsahující FOXO4 a proti databázi obsahující pepsin a nepenthesin 1 (vyloučení možných autoproteolytických produktů), identifikoval vzniklé peptidové produkty štěpení.

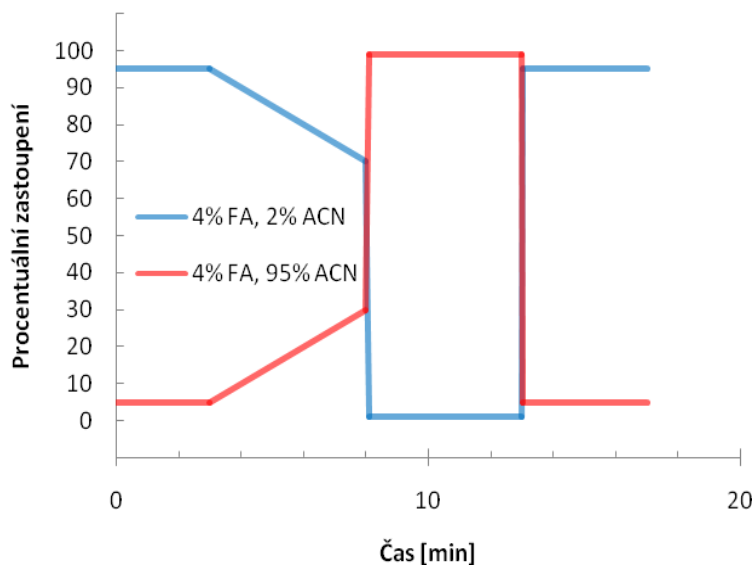


Graf 2: Složení mobilní fáze pumpované HPLC systémem Agilent 1200 v průběhu LC-MSMS analýzy. Doplněno shrnující tabulkou zastoupení roztoků mísených v různých poměrech k vytvoření mobilní fáze. Čas 0 odpovídá přepnutí nástřikového ventilu do polohy dávkování, čas 3 min přepnutí přepínacího ventilu do polohy vymývání.

4.2.4 LC-MS analýza produktů vodík/deuteriové výměny

Deuteriem značené vzorky připravené dle kap. 4.2.2 uchovávané při -80°C byly rozmrazeny a neprodleně dávkovány nástřikovým ventilem do nástřikové smyčky. Zbytek LC-MS analýzy odpovídá postupu popsaném v kap. 4.2.3 s vynecháním fragmentace iontů v datově závislém módu a modifikací časového průběhu (viz Graf 3). Ke zpracování výsledných dat byly použity programy DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonics) a DeutEx (Kavan, Man). Principem vyhodnocení dat programem DeutEx je výpočet relativní míry deuterace každého identifikovaného peptidu na základě rovnice (2) uvedené v kap. 1.8.

Čas [min]	4% FA, 2% ACN [%]	4% FA, 95% ACN [%]
0 → 3	95	5
3 → 8	95 → 70	5 → 30
8 → 8,1	70 → 1	30 → 99
8,1 → 13	1	99
13 → 13,01	1 → 95	99 → 5
13,01 → 17	95	5



Graf 3: Složení mobilní fáze pumpované HPLC systémem Agilent 1200 v průběhu LC-MS analýzy. Doplněno shrnující tabulkou zastoupení roztoků mísených v různých poměrech k vytvoření mobilní fáze. Čas 0 odpovídá přepnutí nástřikového ventilu do polohy dávkování, čas 3 min přepnutí přepínacího ventilu do polohy vymývání.

4.3 Chemické síťení

Metodou chemického síťení byly analyzovány vzorky volné FOXO4-DBD a komplexu FOXO4-DBD/DNA (poměr protein : DNA roven 1 : 1,5). Jako činidla byly použity nedeuterované (d0) i deuterované (d4) verze disukcinimidyl glutarátu (DSG) a disukcinimidyl suberátu (DSS) v desetinásobném molárním nadbytku nad proteinem či proteinovým komplexem s DNA.

Byly připraveny tři typy vzorků:

1) Negativní kontroly

Vzorky bez síťovacích činidel o objemu 40 μ l.

2) Kontrolní vzorky se směsí činidel

Reakce volného proteinu nebo komplexu s DNA se směsí nedeuterované a deuterované verze jednoho z činidel. Síťovací reakce probíhala v objemu 40 μ l a obsahovala 20 μ g FOXO4-DBD tj. 33,7 μ M roztok.

3) Kvantifikační vzorky

Reakce volného proteinu s nedeuterovaným činidlem nebo reakce komplexu s DNA s deuterovaným činidlem. Síťovací reakce probíhala v objemu 20 μ l a obsahovala 10 μ g FOXO4-DBD tj. 33,7 μ M roztok.

4.3.1 Příprava vzorků chemického sítění

122,4 μl roztoku FOXO4-DBD o koncentraci 2,45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bylo vyředěno HEPES pufrům (viz kap. 4.1.9) na výsledný objem 510 μl , který byl rozdělen na dvě stejné části po 255 μl . K první části bylo přidáno 30 μl LC-MS H₂O, čímž byl připraven zásobní roztok volné FOXO4-DBD v HEPES pufru o 33,7 μM koncentraci. K druhé části bylo přidáno 30 μl 55,0 μM roztoku dvoušroubovice DNA, připraveného obdobně jako v kap. 4.2.1. Tím byl připraven zásobní roztok komplexu FOXO4-DBD/DNA o koncentraci 33,7 μM . Dvacetkrát koncentrované roztoky (6,74 mM) síťovacích činidel byly připraveny navážením činidla a jeho rozpuštěním v dopočítaném množství dimethylsulfoxidu (DMSO).

Negativní kontroly byly připraveny smícháním 38 μl zásobních roztoků (volný protein nebo komplex s DNA) a 2 μl LCMS H₂O.

Kontrolní vzorky se směsí činidel byly připraveny smícháním 38 μl zásobních roztoků (volný protein nebo komplex s DNA) a 2 μl předem připravené směsi d0 a d4 činidla v poměru 1 : 1.

Kvantifikační vzorky byly připraveny smícháním 19 μl zásobních roztoků (volný protein nebo komplex s DNA) a 1 μl d0 nebo d4 činidla.

Reakce probíhaly 2 hodiny při teplotě 20 °C. Následně byly spojeny reakce s odpovídajícími d0 a d4 činidly, čímž vznikly vzorky F_DSS a F_DSG o objemu 40 μl . Složení ostatních reakčních směsí je shrnuto v Tab. 2.

Tab. 2: Shrnutí složení reakčních směsí chemického sítění

Negativní kontroly Název vzorku	Obsah jednotlivých zásobních roztoků [μl]		
	FOXO4-DBD	FOXO4-DBD/DNA	LCMS H ₂ O
F_CTRL	38	–	2
F-DNA_CTRL	–	38	2

Kontrolní vzorky se směsí činidel Název vzorku	Obsah jednotlivých zásobních roztoků [μl]					
	FOXO4-DBD	FOXO4-DBD/DNA	DSGd0	DSGd4	DSSd0	DSSd4
F_DSG_MIX	38	–	1	1	–	–
F_DSS_MIX	38	–	–	–	1	1
F-DNA_DSG_MIX	–	38	1	1	–	–
F-DNA_DSS_MIX	–	38	–	–	1	1

Kvantifikační vzorky Název vzorku	Obsah jednotlivých zásobních roztoků [μl]					
	FOXO4-DBD	FOXO4-DBD/DNA	DSGd0	DSGd4	DSSd0	DSSd4
F_DSGd0	19	–	1	–	–	–
F_DSSd0	19	–	–	–	1	–
F-DNA_DSGd4	–	19	–	1	–	–
F-DNA_DSSd4	–	19	–	–	–	1

4.3.2 Analýza produktů síťovací reakce elektroforézou v polyakrylamidovém gelu

Z každého vzorku připraveného dle kap. 1.3.1 bylo odebráno 20 μl reakční směsi a podrobena elektroforetické separaci v gelu. Vzorky byly připraveny vyředěním odebraných 20 μl vzorku 5 μl čtyřikrát koncentrovaného redukujícího LDS vzorkového pufru zahřátím 5 min při 90 °C. Po inkubaci byly vzorky nanášeny do jamek komerčního polyakrylamidového gelu NuPAGE s koncentračním gradientem polyakrylamidu 4 – 12% (8 × 8 × 0,1 cm). Byl použit komerční elektrodový pufr MES SDS. Elektroforetická separace probíhala 50 min při napětí 25 mA na každý gel. Vizualizace separovaných produktů síťení byla provedena obarvením barvicím roztokem Coomassie Brilliant Blue po dobu 20 min. Nespecificky obarvené pozadí bylo odbarveno odbarvovacím roztokem.

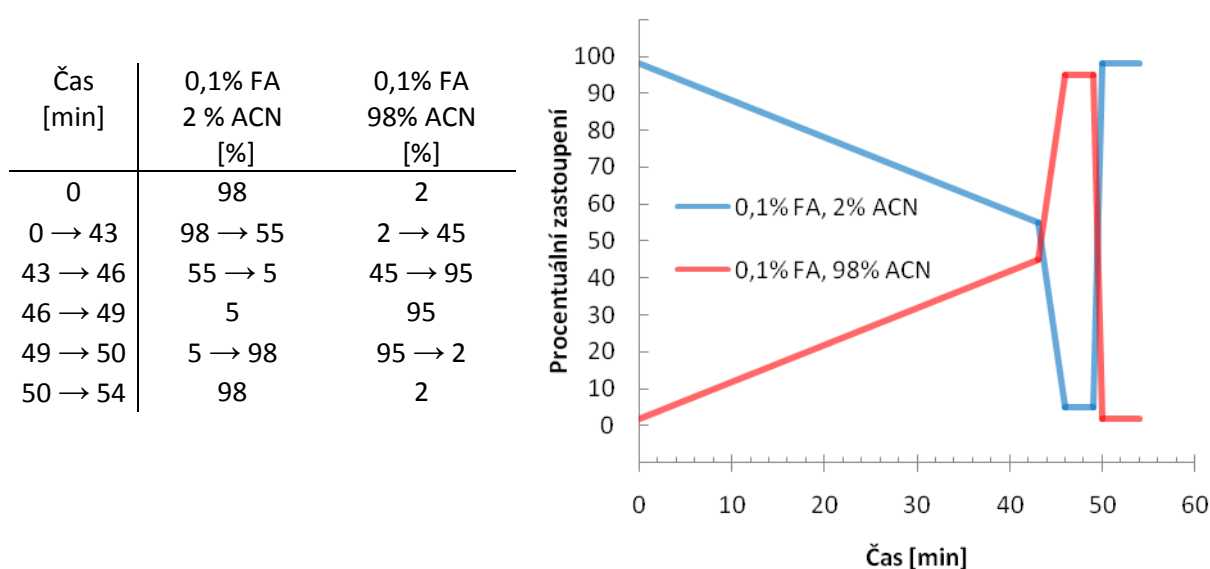
4.3.3 Proteolytické štěpení produktů chemického síťení

Dále bylo ze vzorků připravených dle kap. 1.3.1 odebráno 10 μl reakční směsi, ke které byl přidán 1 μl ACN a 1 μl roztoku trypsinu (0,25 μg/μl). Poměr proteinu k protease v reakci činil 20 : 1. Štěpení probíhalo 13 h při 37 °C, přičemž po 6 hodinách byl přidán další 1 μl roztoku trypsinu.

4.3.4 LC-MS analýza produktů chemického síťení

Ke každé reakční směsi připravené dle kap. 1.3.3 bylo pro snížení aktivity proteasy (trypsinu) a hydrolýze možných zbytků síťovacích činidel přidáno 1,5 μl 0,05% kyseliny mravenčí, čímž bylo pH roztoku sníženo na 5,5. Následně byl odebrán 1 μl okyselené reakční směsi, který byl 0,1% FA vyředěn na celkových 10 μl. Vzorky byly přeneseny do vialek, přičemž každá vialka obsahovala směs modifikovaných peptidů o koncentraci 0,05 μg/μl. Zbylé okyselené reakční směsi byly zmrazeny a uchovávány při – 80°C.

LC-MS analýza směsi modifikovaných peptidů započala automatickým nanesením 2 μl vzorku o koncentraci 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ do HPLC systému UltiMate 3000. Vzorek byl nejprve odsolen na peptidové koloně (Acclaim PepMap 100) průtokem mobilní fáze 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ po dobu 3 min. Z peptidové kolony byly odsolené peptidy vyplaveny mobilní fází s gradientem ACN tvořenou 0,1 % FA a 2 až 98% ACN (viz Graf 4) s rychlostí průtoku 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ na analytickou kolonu Acclaim PepMap 100 C18 s obrácenou fází, kde byly separovány. Peptidová i analytická kolona byly vyhřívány na 60 °C. Separované peptidy byly z HPLC systému přivedeny do FTICR hmotnostního spektrometru solariX XR (Bruker Daltonics) vybaveném nanoESI. Hmotnostně spektrometrická analýza probíhala v pozitivním módu s akvizicí 1 milion datových bodů. Ionty byly v ICR cele akumulovány 0,4 s. Hmotnostní spektrum bylo stanoveno v rozmezí poměrů m/z od 250 do 2000. Instrument byl interně kalibrován standardem *Agilent APCI-L low concentration tuning mix*. Získaná hmotnostní spektra byla vyhodnocena programem DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonics) a dále postoupena programu XLynx, který na základě známé aminokyselinové sekvence a specificity zvolené proteasy vytvoří knihovnu možných produktů chemického sítění, na jejímž základě pak tyto produkty identifikuje v získaných hmotnostních spektrech.



Graf 4: Složení mobilní fáze aplikované na analytickou kolonu průtokem 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ v průběhu LC-MS analýzy produktů chemického sítění štěpených trypsinem. Doplněno shrnující tabulkou zastoupení roztoků v mobilní fázi.

5 Výsledky

5.1 Produkce proteinu

Modelový protein vázající DNA, DNA vazebná doména transkripčního faktoru FOXO4 v rozsahu zbytků 82 až 207 (dále jen FOXO4-DBD), byl připraven transformací produkčního bakteriálního kmene kompetentních buněk *Epicurian Coli* BL-21 plasmidem pET_15b_FOXO4-DBD (V. Obšilová). Plasmid kóduje polyhistidinovou kotvu fúzovanou s N-koncem vlastní FOXO4-DBD (viz Obr. 21). Kotva obsahuje sekvenci, kterou specificky rozpoznává a štěpí trombin. Indukci exprese zajišťuje chromosomálně kódovaná T7 polymerasa pod ve spojení s plasmidovým T7 promotorem pod jehož kontrolou je cílový protein FOXO4-DBD.

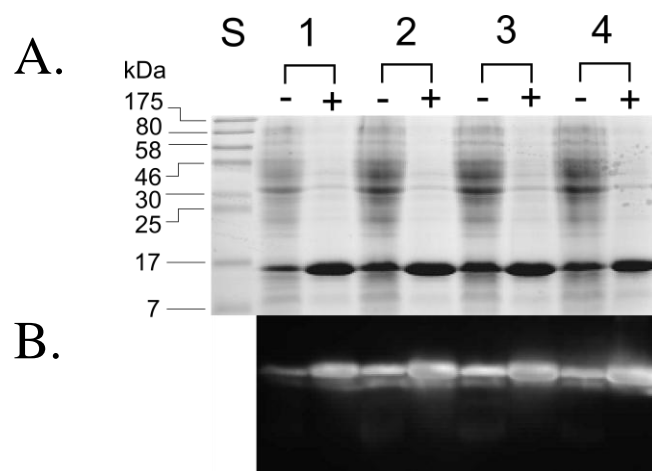
↓

**MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLEDPG₈₂AVTGPRKGGSRRNAWGNQSYAELISQA
IESAPEKRLTLAQIYEWVRTVPYFKDKGDSNSSAGWKNSIRHNLSLHSKFIKVH
NEATGKSSWMLNPEGGKSGKAPRRRAASMDSSSKLLRGRSKA₂₀₇**

Obr. 21: Proteinová sekvence kódovaná expresním plasmidem pET_15b_FOXO4-DBD. Černě vyznačena polyhistidinová kotva, v níž je červeně upřesněna sekvence štěpená trombinem v místě označeném šipkou. Modře je vyznačena DNA vazebná doména transkripčního faktoru FOXO4, přičemž čísla v dolním indexu značí pořadí aminokyseliny v sekvenci FOXO4.

5.1.1 Test produkce proteinu

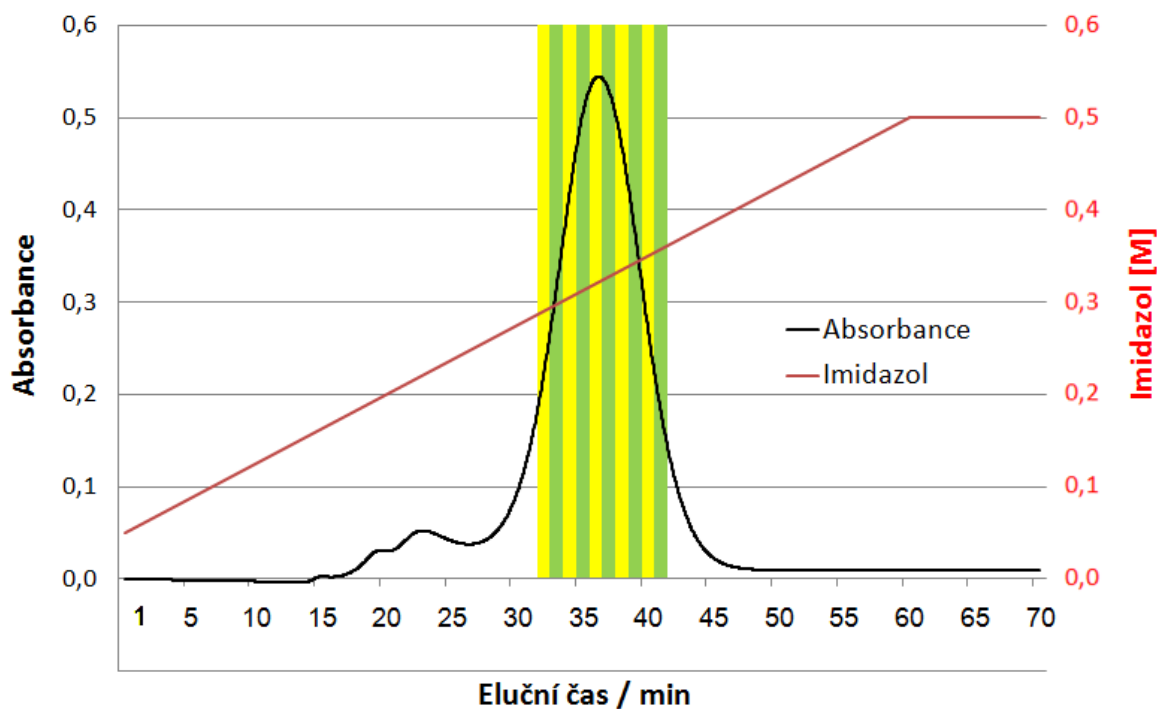
Ze čtyř transformovaných klonů byly připraveny noční kultury, které byly indukovány k expresi proteinu přidavkem IPTG. Lyzáty indukovaných produkčních kultur byly po expresi proteinu analyzovány elektroforetickou separací v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS (SDS-PAGE)(viz Obr. 22, A., str. 62) a dále podrobeny elektropřenosu s následnou imunodetekcí protilátkou rozpoznávající polyhistidinovou kotvu (viz Obr. 22, B., str. 62). Z výsledků plyne, že k produkci proteinu dochází jak u indukovaných, tak u neindukovaných kultur. Indukované kultury však obsahují větší množství FOXO4-DBD, která v jejich buněčném lyzátu tvoří z hlediska přítomných proteinů majoritu, což usnadňuje další zpracování afinitní purifikací.



Obr. 22: Test produkce FOXO4-DBD. SDS-PAGE doplněný elektropřenosem s imunodetekcí protilátkou rozpoznávající polyhistidinovou kotvu. Čísly od 1 do 4 značeny jednotlivé klony produkčních buněk. + označuje kultury indukované k expresi proteinu přidavkem IPTG. – označuje totožné ale neindukované kultury. Jako proteinový standard byl použit *Prestained Protein Marker*. Relativní molekulová hmotnost konstruktu FOXO4-DBD s polyhistidinovou kotvou činí 16567.

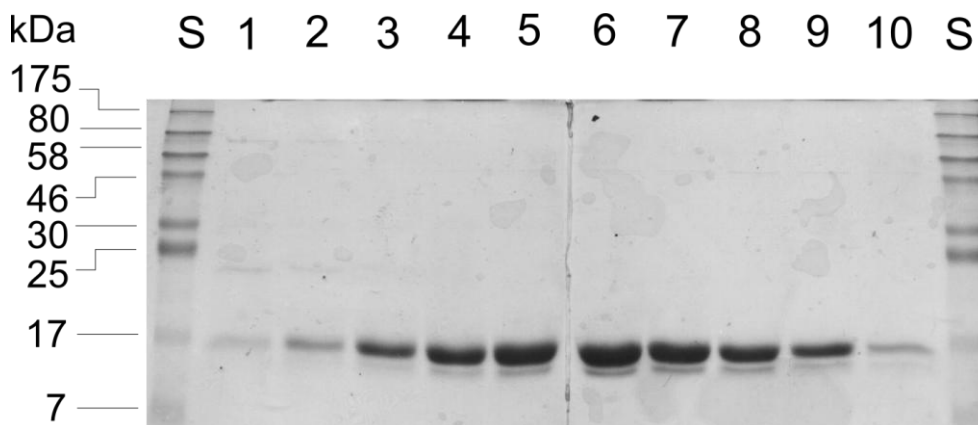
5.1.2 Exprese, izolace a afinitní purifikace

Noční kulturou připravenou namnožením klonu číslo 2 byly zaočkovány celkem 2 l LB média, které byly inkubovány při 37°C. Poté, co buněčné suspenze dosáhly optické denzity při 600 nm v rozmezí od 0,5 do 0,7 a byly ochlazeny na 30°C byla přidavkem IPTG indukována exprese proteinu, která probíhala při této teplotě 12 hodin. Dále byl připraven buněčný lyzát, který byl podroben afinitní purifikaci niklovou chelatační chromatografií. Navážené proteiny byly z kolony eluovány gradientem imidazolu v mobilní fázi. Záznam absorbance eluátu při 280 nm je spolu s koncentrací imidazolu v mobilní fázi vyobrazen na Grafu 5 (str. 63).



Graf 5: Afinitní purifikace FOXO4-DBD niklovou chelatační chromatografií. Záznam absorbance eluátu při 280 nm doplněný o výnos koncentrace imidazolu v mobilní fázi v průběhu chromatografické metody. Žlutými a zelenými pruhy znázorněno 10 odebraných frakcí po 1ml. Vyznačený čas odpovídá době od započetí eluce gradientem imidazolu.

V průběhu eluce proteinu z chromatografické kolony bylo sebráno 10 frakcí po 1 ml. Vzorek z každé frakce (10 µl) byl analyzován SDS-PAGE (viz Obr. 23).

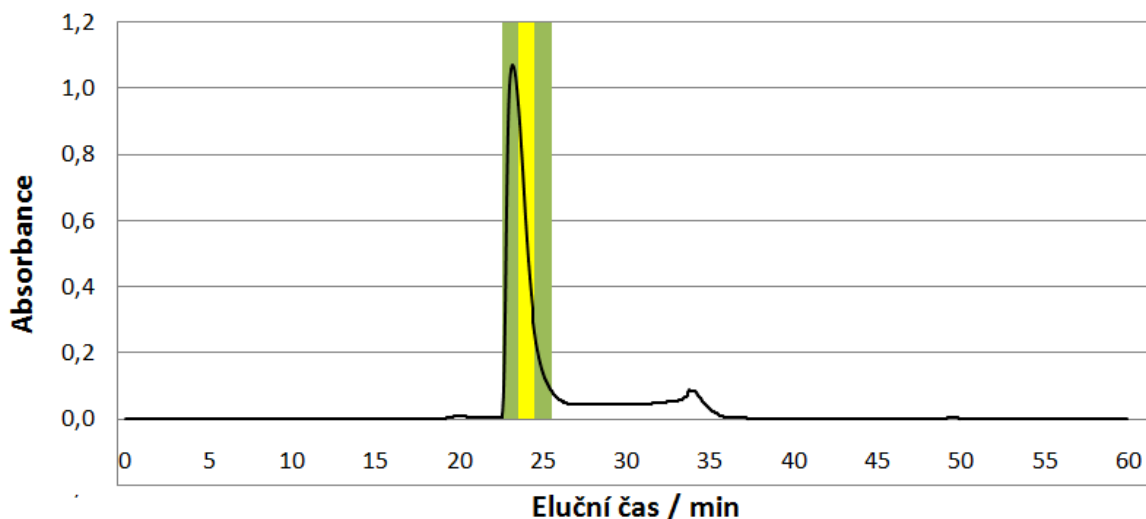


Obr. 23: SDS-PAGE separace frakcí z afinitní purifikace. Odebrané frakce číslovány od 1 do 10, přičemž objem každé frakce činil 1 ml a frakce číslo jedna byla sbírána v průběhu 32. minuty. Frakce číslo 10 byla sbírána v průběhu 41. minuty. Jako proteinový standard (S) byl použit *Prestained Protein Marker*. Relativní molekulová hmotnost konstruktů FOXO4-DBD s polyhistidinovou kotvou činí 16567.

Frakce 3 až 9 byly spojeny a zakoncentrovány na výsledný objem 900 µl. Koncentrace proteinu v roztoku činila 7,18 mg/ml.

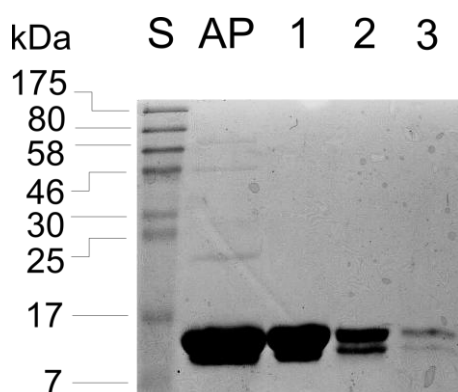
5.1.3 Odštěpení polyhistidinové kotvy a přečištění gelovou permeační chromatografií

Roztok proteinu získaný při afinitní purifikaci byl podroben štěpení thrombinem, čímž byla odštěpena polyhistidinová kotva. Výsledná reakční směs byla přečištěna gelovou permeační chromatografií (viz Graf 6).



Graf 6: Chromatografický záznam gelové permeační chromatografie. Absorbance eluátu měřena při 280 nm. Žlutým a zelenými pruhy jsou vyznačeny tři odebrané frakce.

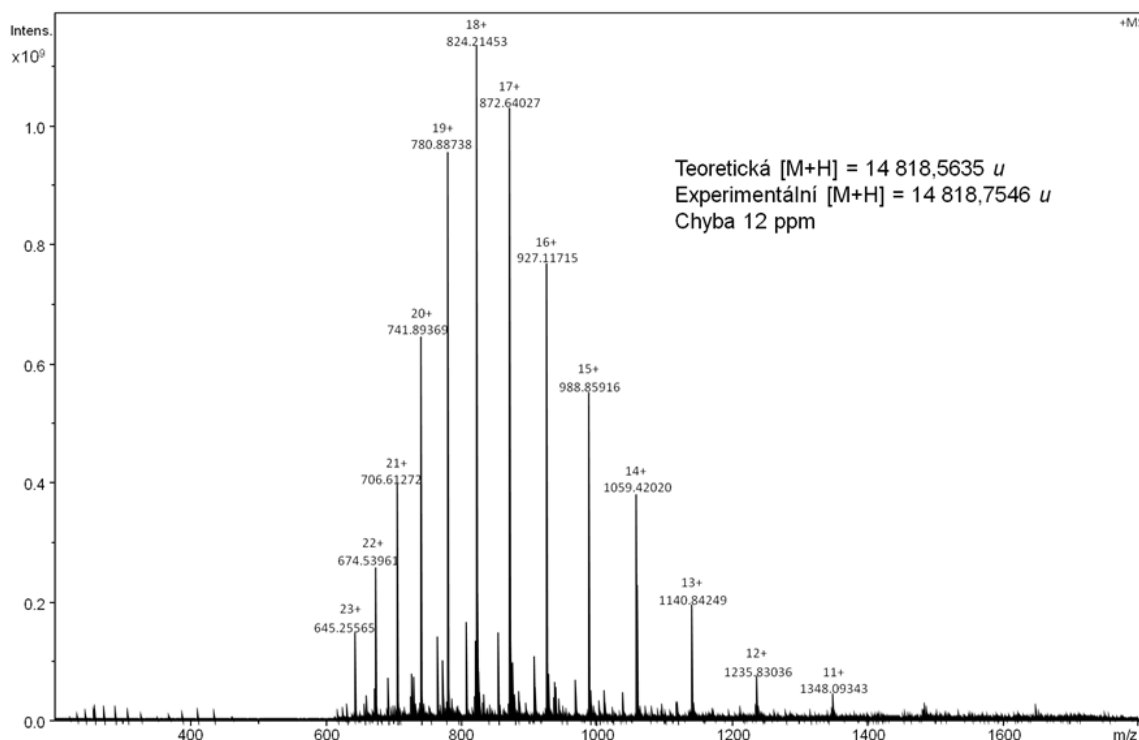
Během eluce byly získány tři frakce po 0,6 ml, které byly analyzovány SDS-PAGE separací (viz Obr. 24). Z výsledků je patrné, že ve srovnání s eluátem z afinitní purifikace proteinu došlo gelovou permeační chromatografií k přečištění produktu. Pro další experimenty byla použita frakce č. 1, u které byla spektrofotometricky stanovena koncentrace proteinu na 2,45 mg/ml.



Obr. 24: SDS-PAGE separace frakcí získaných při gelové permeační chromatografii. AP označuje eluát z afinitní purifikace a čísla od 1 do 3 jednotlivé frakce. Jako proteinový standard (S) byl použit *Prestained Protein Marker*. Relativní molekulová hmotnost konstruktů FOXO-DBD činí 14826.

5.1.4 Hmotnostně spektrometrická charakterizace produktů přípravy proteinu

Vzorek z frakce č. 1 získané při gelové permeační chromatografii obsahující 20 μg proteinu byl podrobem MS analýze. Získané hmotnostní spektrum je zobrazeno na Obr. 25. Poměry m/z vyznačených píků včetně přiřazených nábojových stavů jsou ve shodě s teoretickou monoizotopickou hmotností FOXO4-DBD, jejíž přítomnost v roztoku byla tímto potvrzena.



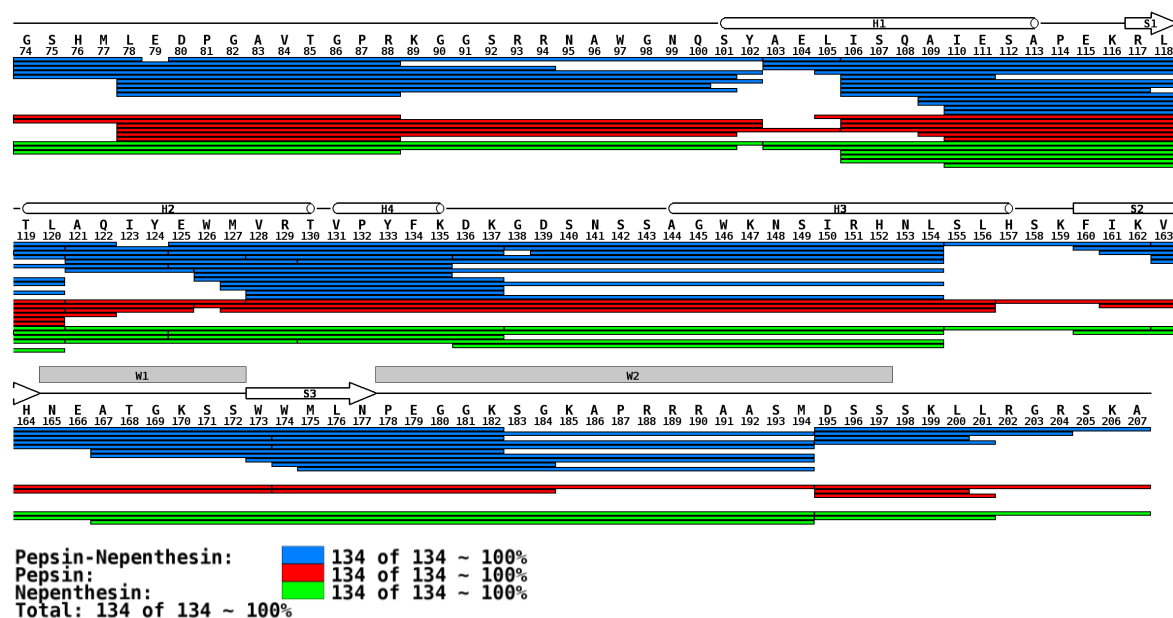
Obr. 25: Hmotnostní spektrum intaktní FOXO4-DBD. Vyznačeny majoritní nábojové stavy s příslušnou hodnotou m/z .

5.2 Vodík/deuteriová výměna

Závislost vodík/deuteriové výměny na době značení byla sledována u FOXO4-DBD i u komplexu FOXO4-DBD s 13 bp dlouhou dvoušroubovicí DNA (dále jen FOXO4-DBD/DNA) v molárním poměru proteinu k DNA rovném 1 : 1. Byly zvoleny následující časové body, ve kterých byla stanovena míra deuterace: 20 s, 2 min, 5 min, 10 min, 30 min, 60 min, 180 min a 300 min.

5.2.1 Optimalizace proteolytického štěpení LC-MS/MS analýzou

Vlastnímu měření vodík/deuteriové výměny předcházela optimalizace proteolytického štěpení, ke kterému dochází na koloně s imobilizovanou proteasou v průběhu chromatografické separace. V rámci optimalizace byly stanoveny peptidové produkty štěpení tří různých proteolytických sestav: kolona s imobilizovaným pepsinem nebo s nepenthesinem 1 nebo kombinace obou kolon v pořadí pepsin-nepenthesin 1 při průtoku mobilní fáze obsahující vzorek FOXO4-DBD 100 μ l/min. Všechny sestavy vykazovaly 100% pokrytí aminokyselinové sekvence. Kombinace proteas však ve srovnání s jednotlivými proteasami poskytla nejlepší prostorové rozlišení dané délkou peptidů (viz Obr. 26). K měření vzorků vodík/deuteriové výměny byla použita kombinace proteasových kolon v pořadí pepsin-nepenthesin 1.



Obr. 26: Srovnání peptidových map získaných na základě LC-MS/MS analýzy produktů štěpení na koloně s imobilizovaným nepenthesinem (modrá), pepsinem (červená) nebo kombinací kolon v pořadí pepsinová-nepenthesinová (zelená). Vytvořeno webovou aplikací DrawMap balíčku MStools¹³⁸.

5.2.2 LC-MS analýza produktů výměny

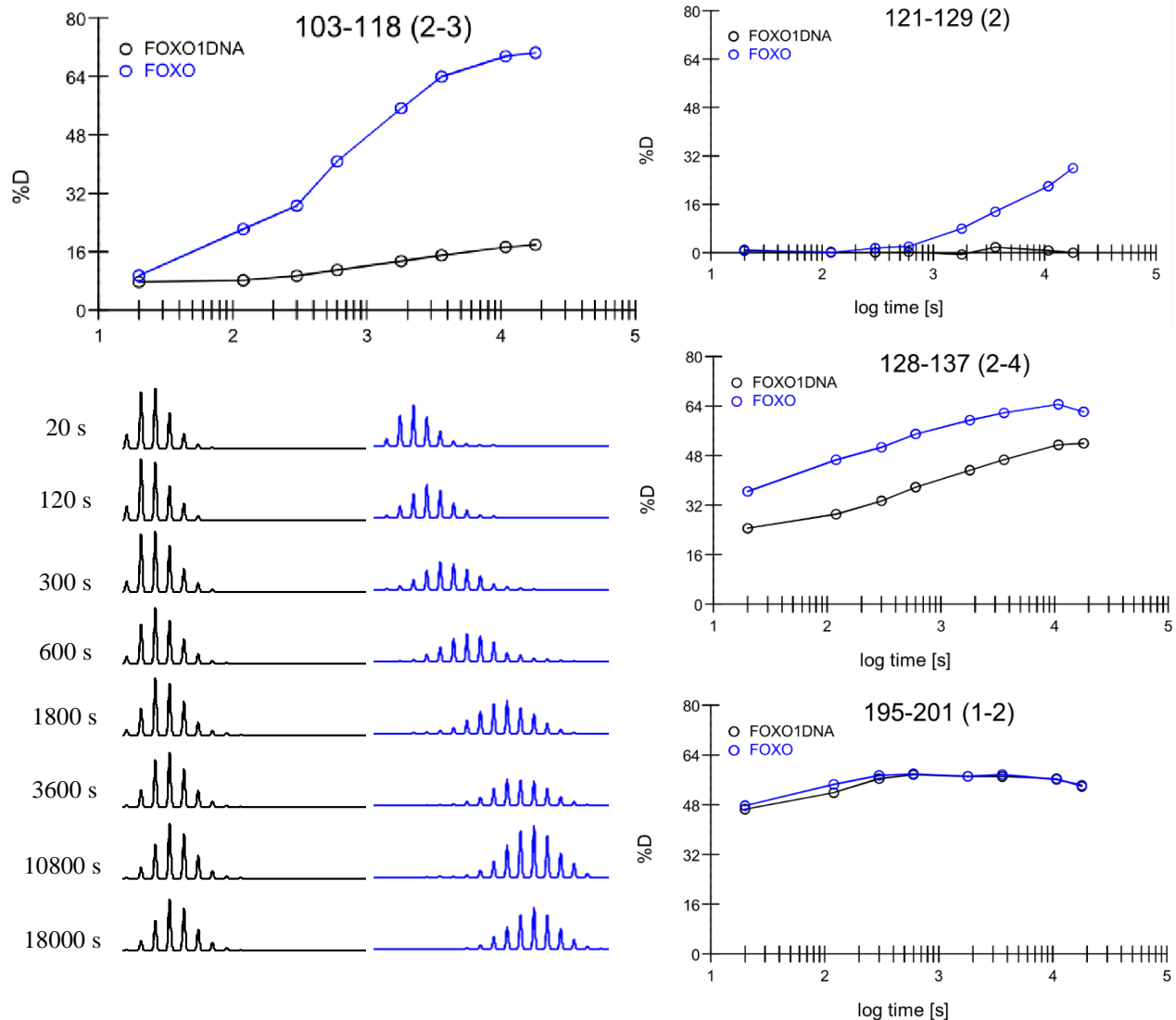
Vzorky proteinu inkubované po definovanou dobu v deuteriovém pufru byly podrobeny LC-MS analýze, při které byly nejprve štěpeny kombinací pepsinu a nepenthesinu 1. Vzniklé peptidy byly odsoleny na peptidové koloně, separovány na analytické koloně s obrácenou fází a následně analyzovány hmotnostním spektrometrem.

Hmotnostní spektra byla vyhodnocena programem DeutEx (Kavan, Man), který vyhledal peptidy a stanovil míru jejich deuterace. Data byla interpretována na základě souboru peptidů identifikovaných pomocí LC-MS/MS analýzy a následné interpretace programem MASCOT. Výsledná míra deuterace byla spočítána dle rovnice (2) str. 37, a vynesena pro každý peptid jako závislost na dekadickém logaritmu času. Čtyři vybrané výnosy jsou zobrazeny na Obr. 27 na str. 68. Kompletní sada výnosů je součástí přílohy (viz. Kap. 9).

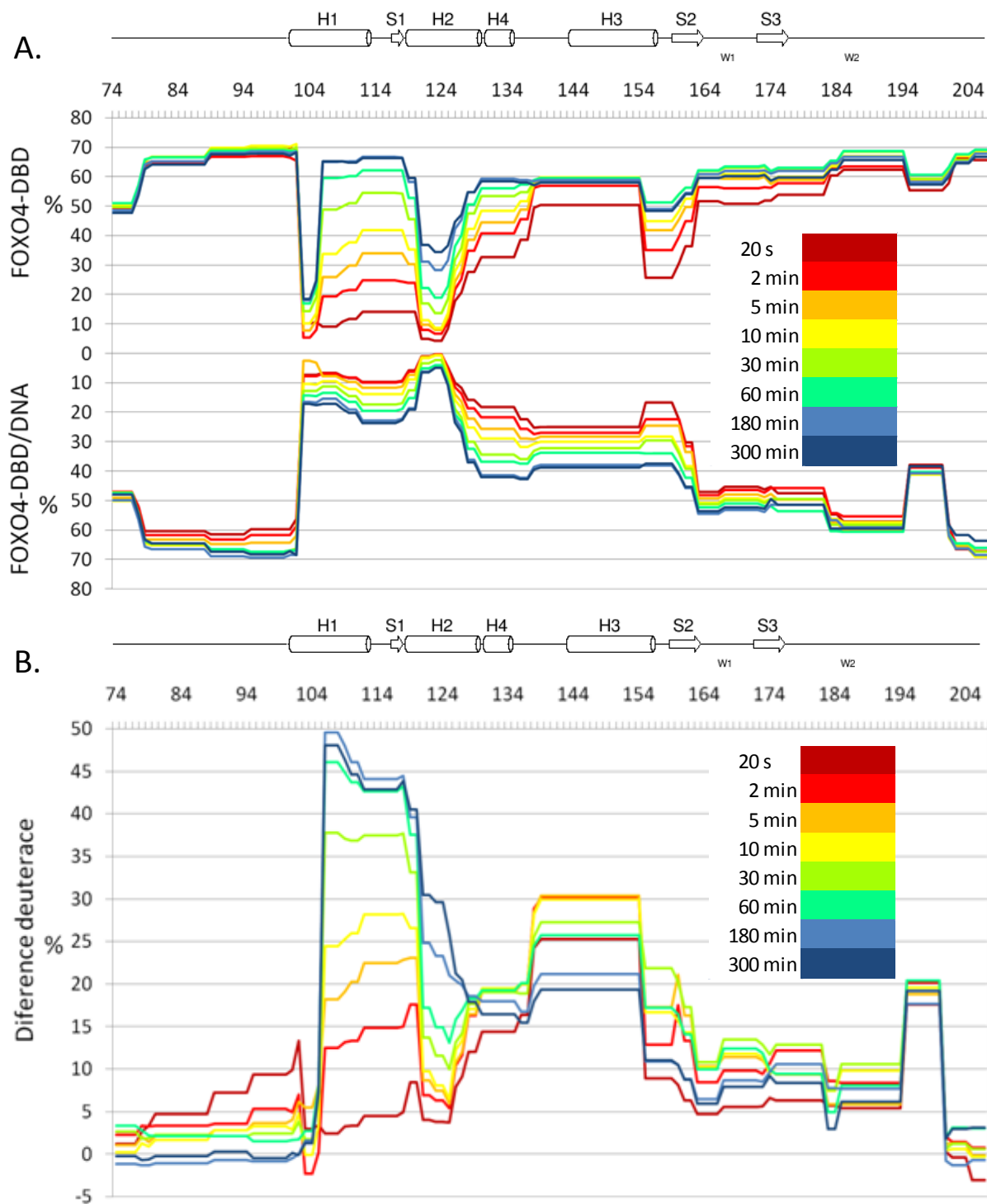
Pro získání lepšího rozlišení byly relativní deuterace peptidů přepočítány na úroveň jednotlivých aminokyselin podle rovnice¹³⁷

$$D_j = \frac{\sum_{i=1}^n D_{ji} \frac{L_j}{l_{ji}}}{\sum_{i=1}^n \frac{L_j}{l_{ji}}} \quad (4),$$

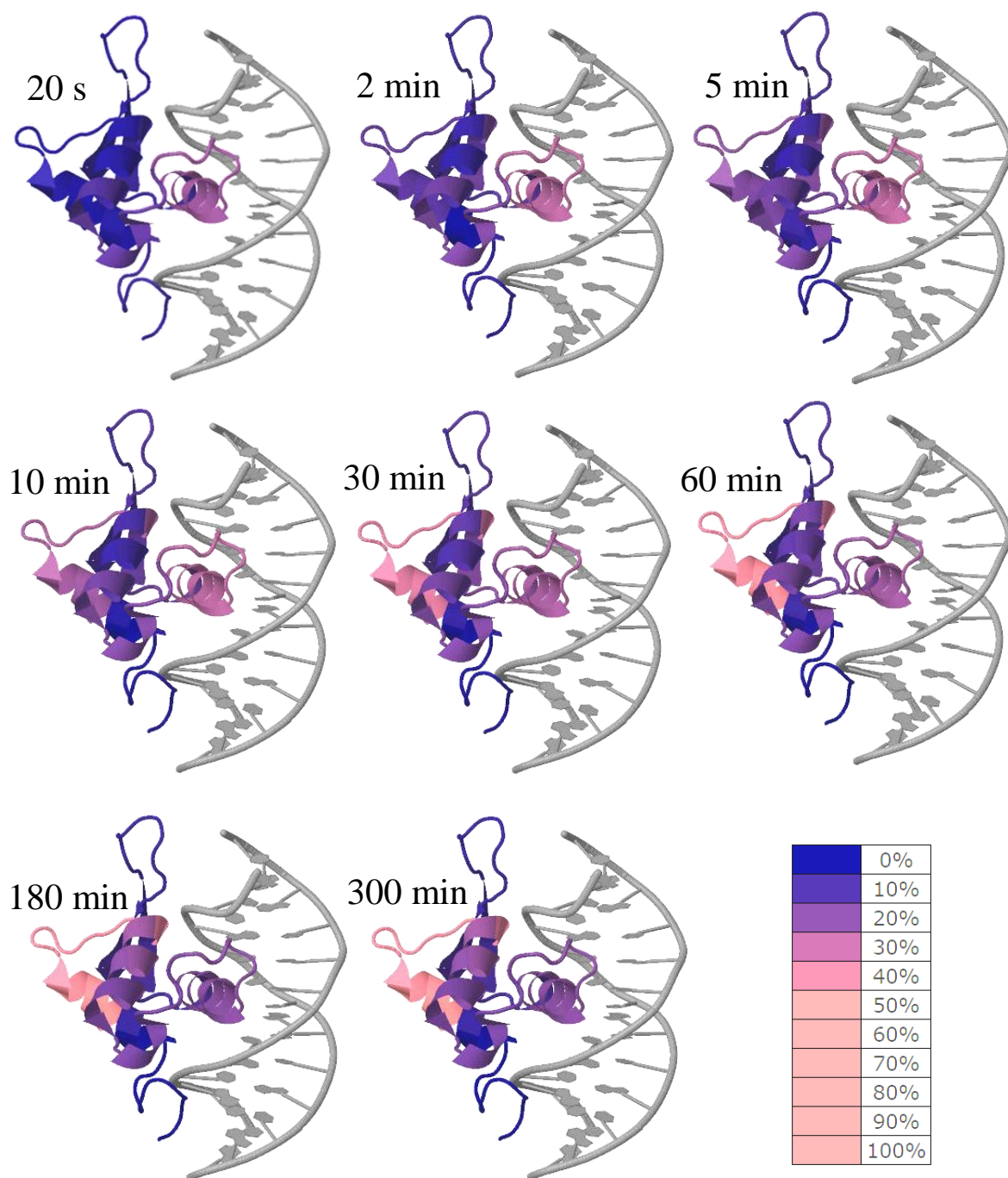
kde j je pořadové číslo aminokyseliny, n množina peptidů obsahující aminokyselinu s pořadovým číslem j , i index peptidu z množiny n , D_{ji} relativní deuterace peptidu s indexem i nesoucím aminokyselinu s pořadovým číslem j , l_{ji} délka tohoto peptidu a L_j je součtem l_{ji} . Výsledná přibližná relativní deuterace aminokyseliny je pak jakýmsi váženým průměrem relativních deuterací všech peptidů, ve kterých je daná aminokyselina obsažena. Větší váhu však mají kratší peptidy. Přibližné deuterace jednotlivých aminokyselin v každém časovém bodě byly vyneseny podél sekvence pomocí webové aplikace *Draw H/D protection plot* balíčku *MSTools* (viz. Obr. 28, A., str. 69)¹³⁸. Obdobně byla vizualizována i diference relativních deuterací mezi volným proteinem a proteinem vázaným v komplexu s DNA (viz Obr. 28, B., str. 69). Současně byly relativní deuterace stejně jako jejich diference mapovány programem *Jmol Scripter* balíčku *MSTools*¹³⁸ na model struktury komplexu FOXO4-DBD/DNA pomocí barevné škály (viz Obr. 29, str. 70).



Obr. 27: Srovnání závislosti relativní deuterace na dekadickém logaritmu času volné FOXO4-DBD a jejího komplexu s DNA pro vybrané peptidy. Popisek každého grafu obsahu rozmezí aminokyselin obsažených v sekvenci peptidu. V závorce uvedeny pozorované nábojové stavy. Pro peptid 103-118 a nábojový stav 2+ jsou zobrazena odpovídající hmotnostní spektra ilustrující posun v čase k vyšším poměrům m/z , odpovídající zvyšující se deuteraci. Rozsah spekter odpovídá minimální (0%) a maximální (100%) teoretické deuteraci. Kompletní data pro všechny pozorované peptidy uvedena v příloze¹³⁸.



Obr. 28: Relativní deuterační přečtená na jednotlivé aminokyselinové zbytky. Zobrazen výnos relativní deuterační v jednotlivých časových bodech pro volnou FOXO4-DBD a komplex FOXO4-DBD/DNA (A). Dále zobrazen rozdíl relativní deuterační komplexu FOXO4-DBD/DNA od volné FOXO4-DBD (B). Zobrazena schematická lineární reprezentace elementů sekundární struktury – α -šroubovice (válec), β -řetězec (šipka). Značení dle nomenklatury faktorů FOX (viz kap. 1.7).



Obr. 29: Výnos rozdílu deuterace v jednotlivých časových bodech zobrazený barevnou škálou na modelu struktury komplexu FOXO4-DBD/DNA¹¹³.

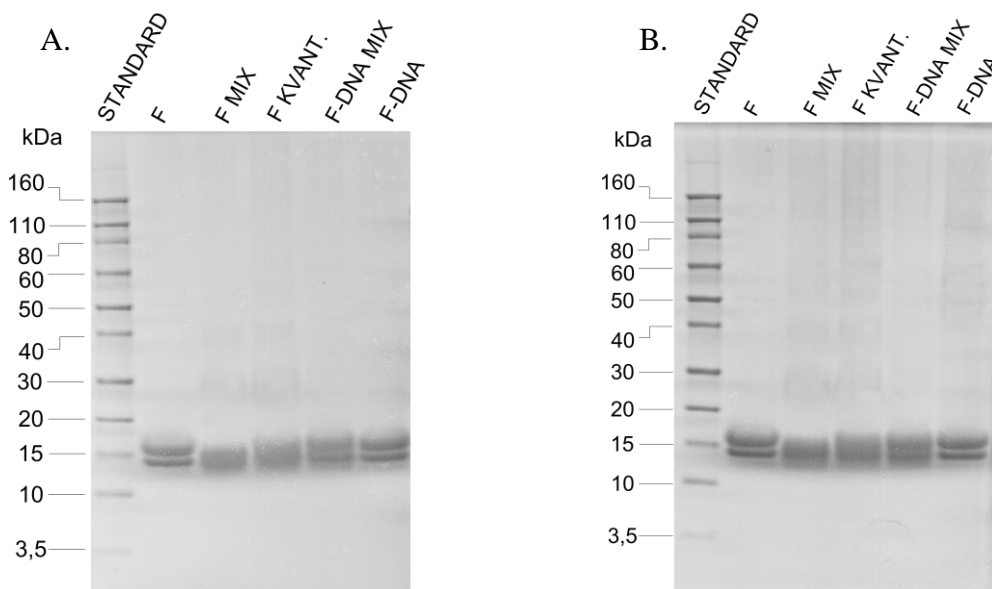
5.3 Chemické sítění

Metodou chemického sítění byly analyzovány vzorky volné FOXO4-DBD a komplexu FOXO4-DBD/DNA (poměr protein : DNA roven 1 : 1,5). Jako činidla byly použity nedeuterované (d0) i deuterované (d4) verze disukcinimidyl glutarátu (DSG)

a disukcinimidyl suberátu (DSS) v desetinásobném molárním nadbytku nad proteinem či proteinovým komplexem s DNA.

5.3.1 Elektroforetická separace chemického sítění proteinu

Proběhnutí síťovací reakce bylo předběžně stanoveno separací části reakční směsi po proběhnutí reakce elektroforetickou v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (viz Obr. 30). Chemické sítění zvyšuje elektroforetickou mobilitu proteinu a způsobuje rozostření obarvených proužků, což je patrné při srovnání se vzorky nemodifikovaného proteinu nebo komplexu s DNA. Z výsledků elektroforetické separace bylo zřejmé, že dimery či vyšší agregáty vzniklé v důsledku nežádoucích intermolekulárních sítění byly v reakční směsi přítomny v zanedbatelném množství. To umožnilo provádět štěpení produktů sítění přímo v roztoku bez nutnosti elektroforetický separovat produkty síťovací reakce.



Obr. 30: Elektroforetická separace produktů síťovací reakce s DSG (A) a DSS (B). F a F-DNA jsou negativní kontroly bez síťovacího činidla, F MIX a F-DNA MIX kontrolní vzorky se směsí značeného a neznačeného činidla a jako F KVANT. jsou označeny vzorky určené ke kvantifikaci. Jako proteinový standard byl použit *Prestained Protein Marker*. Relativní molekulová hmotnost konstruktů FOXO-DBD činí 14 826.

5.3.2 LC-MS analýza chemického sítění produktů proteolýzy

Produkty síťovacích reakcí byly proteolyticky štěpeny trypsinem. Modifikované peptidy kontrolních vzorků (směs značeného a neznačeného činidla) byly podrobeny LC-MS analýze a výsledná hmotnostní spektra byla programem XLYnx porovnána se souborem

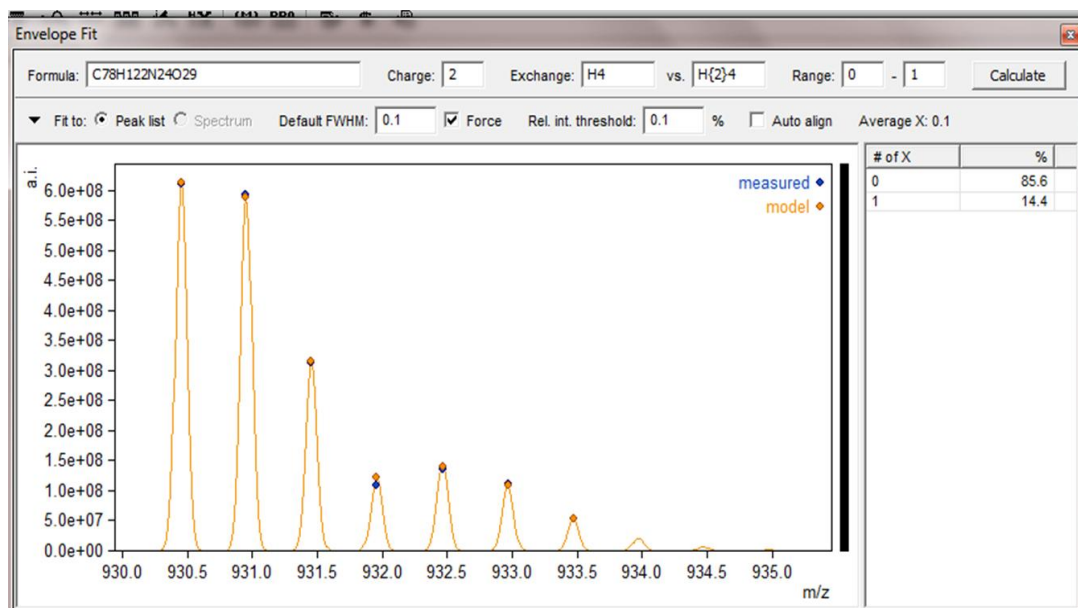
modifikovaných/sítěných peptidů, které mohly při reakcích teoreticky vzniknout. Správnost identifikace chemického sítění byla potvrzena manuální kontrolou v hmotnostních spektrech. Celkem bylo identifikováno 17 různých sítění, které se vyskytovaly alespoň při použití jednoho z činidel (DSG nebo DSS). Čtyři z identifikovaných sítění spojují aminokyselinové zbytky, které oba náleží oblasti se známou prostorovou strukturou (viz Tab. 3).

Tab. 3: Souhrnná tabulka identifikovaných chemických sítění

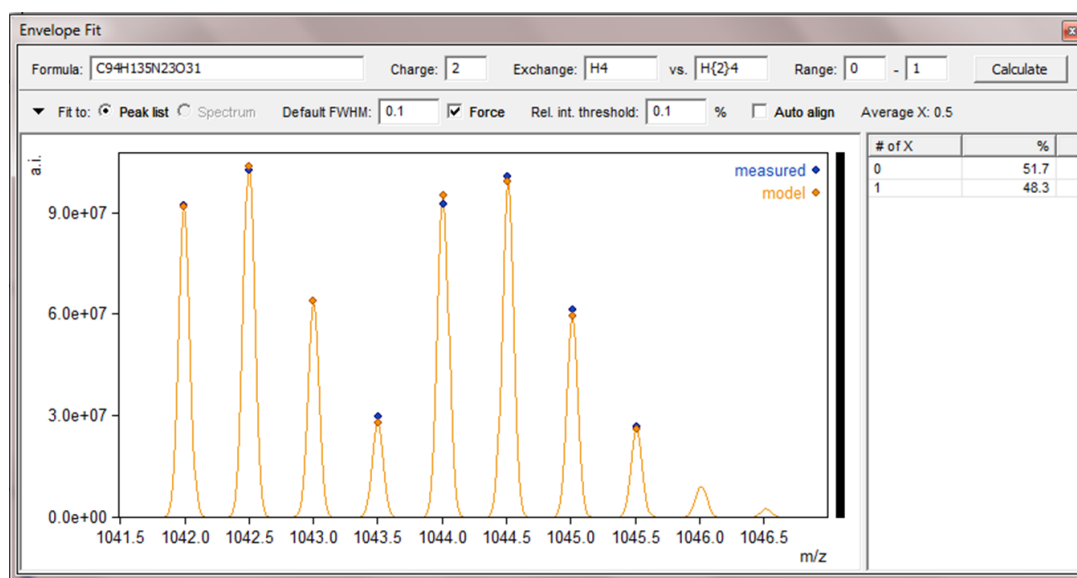
Modifikované aminokyseliny	DSG		DSS		Vzdálenost C _α [Å]
	volná DBD	komplex s DNA	volná DBD	komplex s DNA	
K135-K137	+	+	+	+	5,58
K137-K147	+	+	+	+	10,16
K135-K147	+	+	+	+	13,50
K162-K170	+	+	-	-	13,06
G74-K89	+	+	+	+	-
G74-K137	+	+	+	+	-
G74-K199	+	+	+	+	-
G74-K206	+	+	+	+	-
G74-K135	+	+	+	+	-
K89-K159	+	+	-	-	-
K89-K182	+	+	-	-	-
K162-K185	+	+	-	+	-
K162-K199	+	+	-	-	-
K182-K185	+	+	+	+	-
K182-K206	+	+	-	-	-
K185-K199	+	+	+	-	-
K199-K206	+	+	+	+	-

Kvantifikační vzorky získané smísením vzorku volné DBD modifikované neznačeným činidlem a vzorku komplexu DBD s DNA modifikované deuteriem značeným činidlem v poměru 1 : 1 byly taktéž proteolyticky štěpeny trypsinem. Výsledná hmotnostní spektra byla vyhodnocena programem mMass, který na základě hmotnostního spektra, aminokyselinové sekvence peptidu/ů, síťovacího činidla, nábojového stavu a počtu značících deuterií modeloval izotopové obálky, ze kterých následně určil procentuelní zastoupení neznačené a značené verze chemického sítění. Na Obr. 31 – 33 na str. 74 - 75 jsou vidět náhledy obrazovky při zpracování hmotnostních spekter kvantifikačních vzorků. Obr. 31 na str. 74 znázorňuje případ intrapeptidového sítění K137 a K147 činidlem DSG v rámci peptidu 136-151, kdy ve vzorku zásadně převládá neznačená verze modifikace,

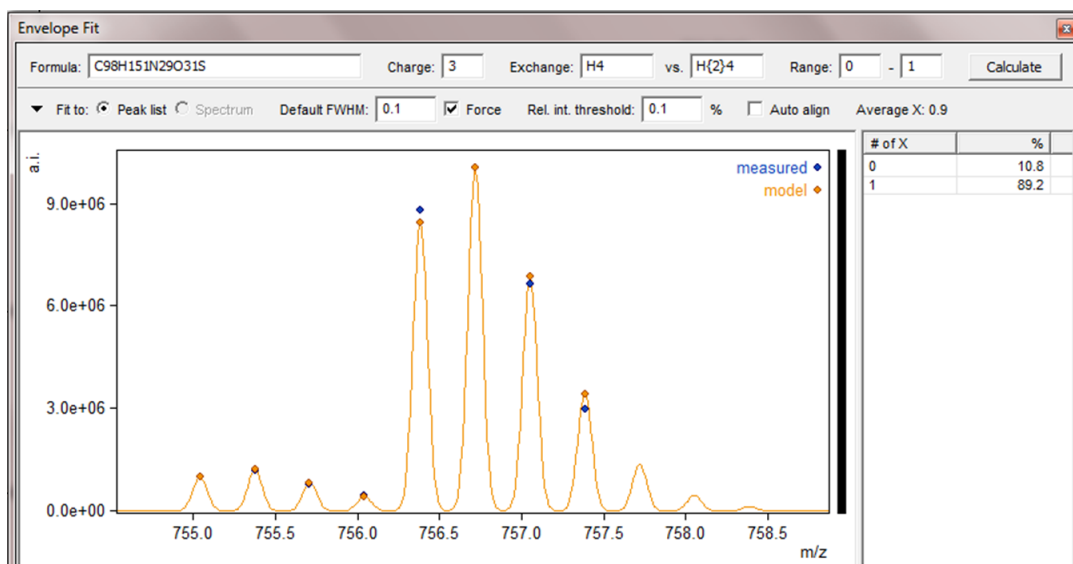
z čehož lze dovodit, že ke vzniku této modifikace dochází preferenčně u volné DBD. Obdobně v případě intrapeptidového sítění K135 a K137 činidlem DSG z Obr. 32 na str. 74 plyne, že k této modifikaci dochází v obou případech se stejnou pravděpodobností. Případ, kdy k modifikaci preferenčně dochází u komplexu DBD s DNA reprezentuje Obr. 33 na str. 75.



Obr. 31: Vyhodnocení kvantifikace intrapeptidového sítění K137 a K147 činidlem DSG v peptidu 136 – 151. Zobrazen náhled obrazovky při vyhodnocování v programu mMass.



Obr. 32: Vyhodnocení kvantifikace intrapeptidového sítění K135 a K137 činidlem DSG v peptidu 130 – 147. Zobrazen náhled obrazovky při vyhodnocování v programu mMass.



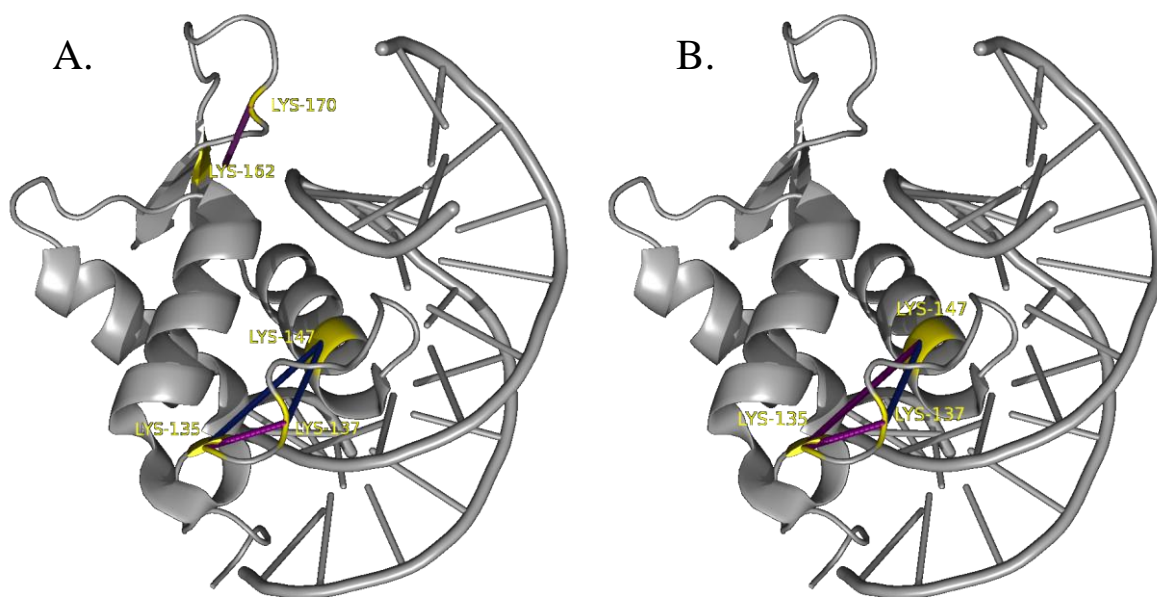
Obr. 33: Vyhodnocení kvantifikace interpeptidového sítění K137 a K147 čínidlem DSG mezi peptidy 89 – 93 a 171 - 185. Zobrazen náhled obrazovky při vyhodnocování v programu mMass.

Tab. 4: Souhrnná tabulka výsledků kvantifikace identifikovaných chemických sítění.

Modifikované aminokyseliny	DSG		DSS	
	volná DBD (d0) [%]	komplex s DNA (d4) [%]	volná DBD (d0) [%]	komplex s DNA (d4) [%]
K135-K137	52	48	36	64
K137-K147	93	7	85	15
K135-K147	86	14	67	33
K162-K170	58	42	-	-
G74-K89	50	50	43	57
G74-K137	44	66	22	78
G74-K199	66	34	58	42
G74-K206	54	46	60	40
G74-K135	17	83	9	91
K89-K159	15	85	-	-
K89-K182	11	89	-	-
K162-K185	45	55	0	100
K162-K199	12	88	-	-
K182-K185	63	37	53	47
K182-K206	64	36	-	-
K185-K199	87	13	100	0
K199-K206	89	11	91	9

Čtyři sítění spojující aminokyseliny uvnitř strukturně charakterizované části byly zakresleny do struktury komplexu FOXO4-DBD s DNA jako spojnice C_{α} uhlíků příslušných lysinových zbytků. Výsledky kvantifikace identifikovaných sítění jsou shrnuty

v Tabulce 4. Podařilo se identifikovat sítě jak ve strukturně charakterizované (tučně zvýrazněné), tak ve strukturně necharakterizované oblasti. Byla získána sítě, která se vyskytují pouze u volné formy domény (K185 - K199, DSS), nebo pouze u komplexu s DNA (K162 - K185, DSS). Dále byla identifikována řada sítí, u kterých se pravděpodobnost vzniku mezi formami výrazně liší.



Obr. 34: Vizualizace vybraných chemických sítí pomocí činidel DSG (A) a DSS (B) spolu s preferencí jejich vzniku při srovnání volné DBD domény a komplexu DBD s DNA. Chemické sítě reprezentuje spojnice C_{α} uhlíků příslušných lysinových zbytků. Modře zobrazena sítě přednostně vznikající ve volné DBD doméně (více než 70% sítí tvořeno neznačenou formou činidla použitého ke značení volné domény). Fialově zobrazena značení bez výrazné preference některého ze stavů. Použit model struktury komplexu FOXO4-DBD s DNA¹¹³.

6 Diskuze

Možnosti studia interakce transkripčních faktorů s DNA byly zkoumány pomocí strukturních MS technik na modelovém proteinu, kterým byla DNA vazebná doména faktoru FOXO4. Tento protein byl vybrán pro dostatek publikovaných strukturních informací popisujících jak stav volné domény ¹¹², tak domény vázané v komplexu s DNA ¹¹³. Motivací pro studium interakcí transkripčních faktorů s DNA je jejich zásadní regulační úloha popsaná v kap. 1.1 a 1.2 a negativní důsledky narušení této regulace včetně maligních procesů. K dnešnímu dni je na základě znalosti lidského genomu predikováno asi 1400 lidských transkripčních faktorů ¹³⁹, přičemž u části z nich (přibližně 900 faktorů dle RSCB) je alespoň částečně vyřešena jejich trojrozměrná struktura. Detailní popis interakce DNA vazebných domén s DNA je pak spíše výjimkou. Metody strukturní charakterizace těchto interakcí pomocí hmotnostní spektrometrie nabízí ve srovnání s technikami s vysokým rozlišením (kap. 1.8.1) přístup s nižší rozlišovací schopností, ale vyšší průchodností a mají i potenciál řešit dané problémy za nativních podmínek nebo dokonce přímo *in vivo*.

V průběhu přípravy proteinu byl proveden test indukované exprese, při kterém byla exprese FOXO4-DBD zjištěna i u kultur, které nebyly k expresi proteinu cíleně indukovány přidavkem IPTG. Tento výsledek lze vysvětlit tzv. *leaky expression*, tedy minimální expresí nezávislou na přítomnosti induktoru exprese danou nestabilitou vazby LacI represoru na DNA¹⁴⁰.

Při purifikaci proteinu byla po každém kroku provedena kontrolní SDS-PAGE. Na všech výsledných gelech byl pozorován zdvojený proužek v oblasti odpovídající mobilitě FOXO4-DBD (viz. Obr. 23, 24 str. 64, resp. 65). Toto je způsobeno přítomností dvou forem FOXO4-DBD, jedné odpovídající 84-207 a druhé, zkrácené o tři aminokyseliny na C-konci (82-204) K tomuto zkrácení dochází nejpozději v průběhu izolace proteinu, protože jej lze pozorovat v průběhu celého zbytku purifikace.

Připravený protein byl zkoumán dvěma přístupy hmotnostní spektrometrie pro studium struktury a interakcí: H/D výměnou a chemickým sítěním. Oběma metodami byla studována jak volná DBD, tak její komplex s DNA s cílem porovnat strukturní změny.

Základními výsledky získanými zpracováním dat z H/D výměny jsou výnosy relativní míry deuterace volné domény a domény v komplexu s DNA v závislosti na době značení

pro jednotlivé peptidy získané proteolytickým štěpením značeného proteinu. Většinu získaných výnosů lze rozdělit do tří skupin podle časového profilu deuterace peptidu v obou stavech. Příkladem prvního deuteračního profilu je peptid 103-118 (viz Obr. 27, str. 68), u kterého se zprvu zanedbatelný rozdíl deuterace mezi oběma stavy s prodlužující se dobou značení výrazně zvyšuje. Deuterace na počátku značení je u obou stavů nízká, přičemž u DBD v komplexu nízká míra deuterace přetrvává i v průběhu 5 hodin značení. Oblast peptidu 103-118 vyměňuje vzhledem k ostatním částem DBD spíše pomalu. Vazba DNA výrazně snižuje celkovou vodík/deuteriovou výměnu. Rozdíly v deuteraci jsou patrné až při delších dobách značení. Obdobné profily deuterace lze pozorovat u všech peptidů regionu 103 - 120, který je tvořen α -šroubovicí H1 a navazující smyčkou, která jej spojuje s α -šroubovicí H2 a obsahuje malý dvouaminokyselinový β -řetězec S1, participující na tvorbě β -skládaného listu s řetězcí S2 a S3. Tento region je následován oblastí mezi zbytky 121-129 (α -šroubovice H2), která vyměňuje velmi pomalu (první detekovaná vodík/deuteriová výměna v časovém bodě 10 min). Navázáním DNA navíc dochází k prakticky úplnému zamezení výměny, jak lze vidět na příkladu peptidu 121-129 (viz Obr. 27, str. 68). Druhý pozorovaný deuterační profil je charakteristický konstantním rozdílem v míře vodík/deuteriové výměny mezi volnou DBD a jejím komplexem s DNA po celou dobu značení. Tento profil výměny se vyskytuje u peptidů v oblasti zbytků 125 – 194. Příkladem může být peptid 128-137 (viz Obr. 27, str. 68). Vazba DNA i v těchto případech snižuje vodík/deuteriovou výměnu. Poslední skupinu tvoří peptidy N- a C-konce připraveného konstrukt DBD. Rozdíl v časových závislostech míry deuterace na časech je mezi volnou doménou a komplexem s DNA minimální. Spolu s celkově vysokým procentem vyměněných deuterií to naznačuje přítomnost nestrukturovaných úseků, které nejsou ovlivněny vazbou DNA. Jako příklad takového peptidu je na Obr. 27 na str. 68 uveden výnos pro peptid 195-201.

Z výše diskutovaných výsledků je zřejmé, že peptidy lišící se profilem deuterace mohou obsahovat shodnou část sekvence (např.: 121-129 a 125-135). Z tohoto důvodu bylo třeba přepočítat experimentálně získané relativní deuterace na úroveň jednotlivých aminokyselin. Získané relativní deuterace jednotlivých aminokyselin pro oba stavy DBD byly vyneseny podél aminokyselinové sekvence. Stejně tak byl vynesen i rozdíl relativních deuterací obou stavů. Z těchto výnosů plyne, že největší rozdíly v deuteraci vykazuje α -šroubovice H1 a přilehlá smyčka spolu s β -řetězcem S1, dále pak oblast α -šroubovice

H3. Tyto výsledky jsou ve shodě s publikovanou strukturou komplexu FOXO4-DBD s DNA, kde je α -šroubovice H3 zodpovědná za velkou část kontaktů s dvoušroubovicí DNA. Otázkou zůstává role šroubovice H1 a přilehlé smyčky při tvorbě komplexu. Možným vysvětlením je stabilizace struktury této části v důsledku interakce regionů, které ji ohraničují s DNA, jmenovitě interakce N-koncových aminokyselinových zbytků a α -šroubovice H3, popsanych na základě krystalové struktury komplexu. Rozhodujícím výsledkem studie vodík/deuteriové výměny je schopnost identifikovat regiony, jejichž struktura je vazbou DNA na transkripční faktor pozměněna nebo je zde v důsledku vazby snížena přístupnost rozpouštědla.

Druhým přístupem ke studiu struktury a interakcí transkripčního faktoru a jeho komplexu s DNA byla metoda chemického sítění, při které byla pomocí deuteriem značených činidel porovnána četnost vzniku jednotlivých sítění ve volné doméně a v komplexu s DNA. 13 z celkových 17 identifikovaných sítění (viz Tab. 4, str. 74) spojovalo aminokyselinové zbytky, z nichž alespoň jeden ležel mimo strukturně charakterizovanou část. U zbylých čtyř sítění bylo možné z publikované struktury komplexu s DNA určit vzdálenost C_{α} uhlíků kovalentně spojených aminokyselin (viz Tab. 3, str. 72), která by měla pro sítění činidlem DSG být menší než 20 Å a pro sítění činidlem DSS menší než 24 Å (v úvahu je brána délka obou aminokyselinových zbytků spojených činidlem). Těmito kritériím vyhověla všechna čtyři sítění. Dvě z nich (K135-K137, K162-K170) nevykazovala významnou preferenci ke vzniku ve volné doméně ani v komplexu s DNA. V případě sítění mezi K135 a K137 je možné, že blízkost lysinových zbytků neumožňuje, aby změna struktury v důsledku vazby DNA zásadně omezila či posílila jeho vznik. Přesto při porovnání výskytu sítění u obou činidel dostáváme mírné zvýhodnění vzniku sítění v komplexu s DNA při použití DSS (64%), jehož spojka je ve srovnání s DSG přibližně o 4 Å delší. Během vazby DNA není přístup ke zbytkům K135 a K137 stericky molekulou DNA nikterak omezen a je pravděpodobné, že v důsledku vazby dochází k mírné deformaci okolí těchto zbytků, jejímž důsledkem je oddálení ϵ -aminoskupin lysinových zbytků.

Sítění K135-K147 a K137-K147 vznikala přednostně ve volné formě, přičemž v obou případech se rozdíl výskytu v obou formách při prodloužení činidla zmenšil. Ani v tomto případě netvoří DNA sterickou překážku bránící činidlu v modifikaci lysinových zbytků. Možným důvodem je oddálení lysinových ϵ -aminoskupin vysvětlující snížení výskytu

obou sítěni v průběhu tvorby komplexu, stejně jako snížení rozdílu při použití činidla s delší spojkou. Tuto hypotézu podporuje i zjištění plynoucí z krystalové struktury komplexu s DNA, kdy autoři tvrdí, že na precizním umístění α -šroubovice H3 do velkého žlábků dvoušroubovice DNA se podílejí aminokyselinové zbytky smyčky mezi α -šroubovicemi H2 a H3 (Y133, F134) a N-koncového regionu (W97, Y102), které spolu s W146 tvoří při vazbě DNA stabilní hydrofobní klastr. Právě interakce těchto zbytků může být důvodem deformace smyčky mezi H2 a H3, znesnadňující vznik diskutovaných sítění. V kontextu výsledků chemického sítění je možné hledat souvislost mezi tvorbou hydrofobního klastru a strukturní změnou přilehlých regionů, především α -šroubovice H2, která při studiu vodík/deuteriové výměny vykazovala nejmarkantnější rozdíl výměny při srovnání volné domény se vznikajícím komplexem s DNA.

Třináct identifikovaných sítění zasahujících do strukturně necharakterizované části může být dále spolu s publikovanými strukturními modely FOXO4-DBD a dalších homologních domén použito k navržení modelu dosud strukturně nevyřešených N- a C-koncových regionů.

Závěrem lze konstatovat, že obě metody, jmenovitě H/D výměna a chemické sítění, lze s úspěchem použít ke studiu struktury transkripčních faktorů a jejich interakce s DNA. Získané informace dokreslují a rozšiřují základní poznatky získané pomocí vysoko rozlišujících technik. Dalším krokem studia interakce transkripčních faktorů s DNA pomocí hmotnostní spektrometrie je chemické sítění mezi proteinem a DNA. Sítění mezi DNA vazebnou doménou FOXO4 a DNA pomocí trans-platiny již bylo v Laboratoři strukturní biologie a buněčné signalizace provedeno. Konečným cílem je modifikace metody sítění mezi proteiny a DNA pro použití *in vivo* s potenciálem identifikovat ve velkém měřítku úseky DNA spolu s proteiny, které je váží.

7 Shrnutí

Cílem této diplomové práce byla příprava rekombinantní DNA vazebné domény transkripčního faktoru FOXO4 a následné ověření možnosti strukturně charakterizovat jeho interakci s DNA pomocí hmotnostní spektrometrie. Získané výsledky lze shrnout takto:

- DNA vazebná doména faktoru FOXO4 byla rekombinantně připravena v produkčním bakteriálním kmeni a následně purifikována.
- Metodou vodík/deuteriové výměny byla získána strukturní informace o volné DNA vazebné doméně a o jejím komplexu s DNA se 100% pokrytím aminokyselinové sekvence.
- Metodou chemického sítění bylo identifikováno 17 sítěných dvojic aminokyselin, u kterých byla dále určena preference jejich sítění pro volnou DNA vazebnou doménu i pro doménu v komplexu.
- Porovnání výsledků získaných pro volný protein s výsledky získanými pro protein v komplexu umožnilo identifikaci regionů měnících při vazbě DNA konformaci.

Závěrem lze konstatovat, že metodami strukturní hmotnostní spektrometrie, jmenovitě vodík/deuteriovou výměnou a chemickým sítěním, se nám podařilo studovat strukturní stránku interakce mezi proteiny (např.: transkripční faktory) a DNA. Dalším cílem bude doplnit získané informace o data z protein-DNA sítění. Na základě těchto informací se pokusit o modelování dosud strukturně necharakterizovaných úseků. Dlouhodobým cílem bude zavedení těchto metod pro využití *in vivo* s možností studia dalších transkripčních faktorů.

8 Seznam použité literatury

- (1) Saha, A.; Wittmeyer, J.; Cairns, B. R. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, 7 (6), 437–447.
- (2) Allfrey, V. G.; Faulkner, R.; Mirsky, A. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1964**, 51 (1938), 786–794.
- (3) Lee, D. Y.; Hayes, J. J.; Pruss, D.; Wolffe, A. P. *Cell* **1993**, 72 (1), 73–84.
- (4) Kaochar, S.; Tu, B. P. *Trends Biochem. Sci.* **2012**, 37 (11), 477–483.
- (5) Wang, W.; Xue, Y.; Zhou, S.; Kuo, A.; Cairns, B. R.; Crabtree, G. R. *Genes Dev.* **1996**, 10 (17), 2117–2130.
- (6) Havas, K.; Flaus, A.; Phelan, M.; Kingston, R.; Wade, P. A.; Lilley, D. M. J.; Owen-Hughes, T. *Cell* **2000**, 103 (7), 1133–1142.
- (7) Lorch, Y.; Maier-Davis, B.; Kornberg, R. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103 (9), 3090–3093.
- (8) Shogren-Knaak, M.; Ishii, H.; Sun, J.-M.; Pazin, M. J.; Davie, J. R.; Peterson, C. L. *Science* **2006**, 311 (5762), 844–847.
- (9) Nowak, S. J.; Corces, V. G. *Trends Genet.* **2004**, 20 (4), 214–220.
- (10) Zhang, Y.; Reinberg, D. *Genes Dev.* **2001**, 15 (18), 2343–2360.
- (11) Li, H.; Ilin, S.; Wang, W.; Duncan, E. M.; Wysocka, J.; Allis, C. D.; Patel, D. J. *Nature* **2006**, 442 (7098), 91–95.
- (12) Jenuwein, T.; Allis, C. D. *Science* **2001**, 293 (5532), 1074–1080.
- (13) Agalioti, T.; Chen, G.; Thanos, D. *Cell* **2002**, 111 (3), 381–392.
- (14) Latchman, D. S. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1997**, 29 (12), 1305–1312.
- (15) Yang, C.; Bolotin, E.; Jiang, T.; Sladek, F. M.; Martinez, E. *Gene* **2007**, 389 (1), 52–65.
- (16) Sawada, S.; Scarborough, J. D.; Killeen, N.; Littman, D. R. *Cell* **1994**, 77 (6), 917–929.
- (17) Saltzman, A. G.; Weinmann, R. *FASEB J.* **1989**, 3 (6), 1723–1733.
- (18) Kim, Y. J.; Björklund, S.; Li, Y.; Sayre, M. H.; Kornberg, R. D. *Cell* **1994**, 77 (4), 599–608.

- (19) Stiller, J. W.; Hall, B. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99* (9), 6091–6096.
- (20) Phatnani, H. P.; Greenleaf, A. L. *Genes Dev.* **2006**, *20* (21), 2922–2936.
- (21) Orphanides, G.; Lagrange, T.; Reinberg, D. *Genes Dev.* **1996**, *10* (21), 2657–2683.
- (22) Taatjes, D. J. *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35* (6), 315–322.
- (23) Mizzen, C. A.; Yang, X. J.; Kokubo, T.; Brownell, J. E.; Bannister, A. J.; Owen-Hughes, T.; Workman, J.; Wang, L.; Berger, S. L.; Kouzarides, T.; Nakatani, Y.; Allis, C. D. *Cell* **1996**, *87* (7), 1261–1270.
- (24) Sadowski, C. L.; Henry, R. W.; Lobo, S. M.; Hernandez, N. *Genes Dev.* **1993**, *7* (8), 1535–1548.
- (25) Verrijzer, C. P.; Chen, J.-L.; Yokomori, K.; Tjian, R. *Cell* **1995**, *81* (7), 1115–1125.
- (26) Dikstein, R.; Zhou, S.; Tjian, R. *Cell* **1996**, *87* (1), 137–146.
- (27) Frankel, A. D.; Kim, P. S. *Cell* **1991**, *65* (5), 717–719.
- (28) Wingender, E.; Schoeps, T.; Dönitz, J. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41* (Database issue), 165–170.
- (29) Weiss, M. A.; Ellenberger, T.; Wobbe, C. R.; Lee, J. P.; Harrison, S. C.; Struhl, K. *Nature* **1990**, *347* (6293), 575–578.
- (30) Miller, J.; McLachlan, A. D.; Klug, A. *EMBO J.* **1985**, *4* (6), 1609–1614.
- (31) Klug, A. *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 213–231.
- (32) Aravind, L.; Anantharaman, V.; Balaji, S.; Babu, M. M.; Iyer, L. M. *FEMS Microbiol. Rev.* **2005**, *29* (2), 231–262.
- (33) Weatherman, R. V.; Fletterick, R. J.; Scanlan, T. S. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 559–581.
- (34) Nagy, L.; Schwabe, J. W. R. *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29* (6), 317–324.
- (35) Ferreira, M. E.; Hermann, S.; Prochasson, P.; Workman, J. L.; Berndt, K. D.; Wright, A. P. H. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (23), 21779–21784.
- (36) Hermann, S.; Berndt, K. D.; Wright, A. P. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (43), 40127–40132.
- (37) Gerber, H. P.; Seipel, K.; Georgiev, O.; Höfferer, M.; Hug, M.; Rusconi, S.; Schaffner, W. *Science* **1994**, *263* (5148), 808–811.
- (38) Seipel, K.; Georgiev, O.; Schaffner, W. *EMBO J.* **1992**, *11* (13), 4961–4968.

- (39) Künzler, M.; Braus, G. H.; Georgiev, O.; Seipel, K.; Schaffner, W. *EMBO J.* **1994**, *13* (3), 641–645.
- (40) Li, X. Y.; Virbasius, A.; Zhu, X.; Green, M. R. *Nature* **1999**, *399* (6736), 605–609.
- (41) Choy, B.; Green, M. R. *Nature* **1993**, *366* (6455), 531–536.
- (42) Barberis, A.; Pearlberg, J.; Simkovich, N.; Farrell, S.; Reinagel, P.; Bamdad, C.; Sigal, G.; Ptashne, M. *Cell* **1995**, *81* (3), 359–368.
- (43) Roberts, S. G.; Green, M. R. *Nature* **1994**, *371* (6499), 717–720.
- (44) Lieberman, P. M.; Berk, A. J. *Genes Dev.* **1994**, *8* (9), 995–1006.
- (45) Ozer, J.; Moore, P. A.; Bolden, A. H.; Lee, A.; Rosen, C. A.; Lieberman, P. M. *Genes Dev.* **1994**, *8* (19), 2324–2335.
- (46) Joliot, V.; Demma, M.; Prywes, R. *Nature* **1995**, *373* (6515), 632–635.
- (47) Lorch, Y.; Beve, J.; Gustafsson, C. M.; Myers, L. C.; Kornberg, R. D. *Mol. Cell* **2000**, *6* (1), 197–201.
- (48) Poss, Z. C.; Ebmeier, C. C.; Taatjes, D. J. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2013**, *48* (6), 575–608.
- (49) Berger, S. L. *Nature* **2007**, *447* (7143), 407–412.
- (50) Yamane, K.; Toumazou, C.; Tsukada, Y.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Wong, J.; Zhang, Y. *Cell* **2006**, *125* (3), 483–495.
- (51) Peterson, C. L.; Workman, J. L. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2000**, *10* (2), 187–192.
- (52) Natarajan, K.; Jackson, B. M.; Zhou, H.; Winston, F.; Hinnebusch, A. G. *Mol. Cell* **1999**, *4* (4), 657–664.
- (53) Yudkovsky, N.; Logie, C.; Hahn, S.; Peterson, C. L. *Genes Dev.* **1999**, *13* (18), 2369–2374.
- (54) Inoue, H.; Furukawa, T.; Giannakopoulos, S.; Zhou, S.; King, D. S.; Tanese, N. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (44), 41674–41685.
- (55) Clapier, C. R.; Cairns, B. R. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 273–304.
- (56) Jenster, G.; Spencer, T. E.; Burcin, M. M.; Tsai, S. Y.; Tsai, M. J.; O'Malley, B. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94* (15), 7879–7884.
- (57) Tsukiyama, T.; Becker, P. B.; Wu, C. *Nature* **1994**, *367* (6463), 525–532.
- (58) Lefstin, J. A.; Yamamoto, K. R. *Nature* **1998**, *392* (6679), 885–888.

- (59) Sauer, F.; Fondell, J. D.; Ohkuma, Y.; Roeder, R. G.; Jäckle, H. *Nature* **1995**, *375* (6527), 162–164.
- (60) Tanabe, M.; Sasai, N.; Nagata, K.; Liu, X. D.; Liu, P. C.; Thiele, D. J.; Nakai, A. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (39), 27845–27856.
- (61) Lania, L.; Majello, B.; de Luca, P. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1997**, *29* (12), 1313–1323.
- (62) Yokota, Y. *Oncogene* **2001**, *20* (58), 8290–8298.
- (63) Kakkis, E.; Calame, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84* (20), 7031–7035.
- (64) He, G. P.; Muise, A.; Li, A. W.; Ro, H. S. *Nature* **1995**, *378* (6552), 92–96.
- (65) Toledo, F.; Wahl, G. M. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6* (12), 909–923.
- (66) Han, K.; Manley, J. L. *Genes Dev.* **1993**, *7* (3), 491–503.
- (67) Papp, B.; Müller, J. *Genes Dev.* **2006**, *20* (15), 2041–2054.
- (68) Ahringer, J. *Trends Genet.* **2000**, *16* (8), 351–356.
- (69) Moazed, D. *Nature* **2009**, *457* (7228), 413–420.
- (70) Simon, J. A.; Tamkun, J. W. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2002**, *12* (2), 210–218.
- (71) Gerber, A. N.; Klesert, T. R.; Bergstrom, D. a; Tapscott, S. J. *Genes Dev.* **1997**, *11* (4), 436–450.
- (72) Shen, W. F.; Detmer, K.; Simonitch-Eason, T. a.; Lawrence, H. J.; Largman, C. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19* (3), 539–545.
- (73) Sassone-Corsi, P. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1998**, *30* (1), 27–38.
- (74) Hinnebusch, a. G. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (35), 21661–21664.
- (75) Brivanlou, A. H.; Darnell, J. E. *Science* **2002**, *295* (5556), 813–818.
- (76) Yamamoto, Y.; Gaynor, R. B. *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29* (2), 72–79.
- (77) Grad, I.; Picard, D. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2007**, *275* (1-2), 2–12.
- (78) Horvath, C. M. *Trends Biochem. Sci.* **2000**, *25* (10), 496–502.
- (79) Wood, M. J.; Storz, G.; Tjandra, N. *Nature* **2004**, *430* (7002), 917–921.
- (80) Ito, A.; Lai, C. H.; Zhao, X.; Saito, S.; Hamilton, M. H.; Appella, E.; Yao, T. P. *EMBO J.* **2001**, *20* (6), 1331–1340.

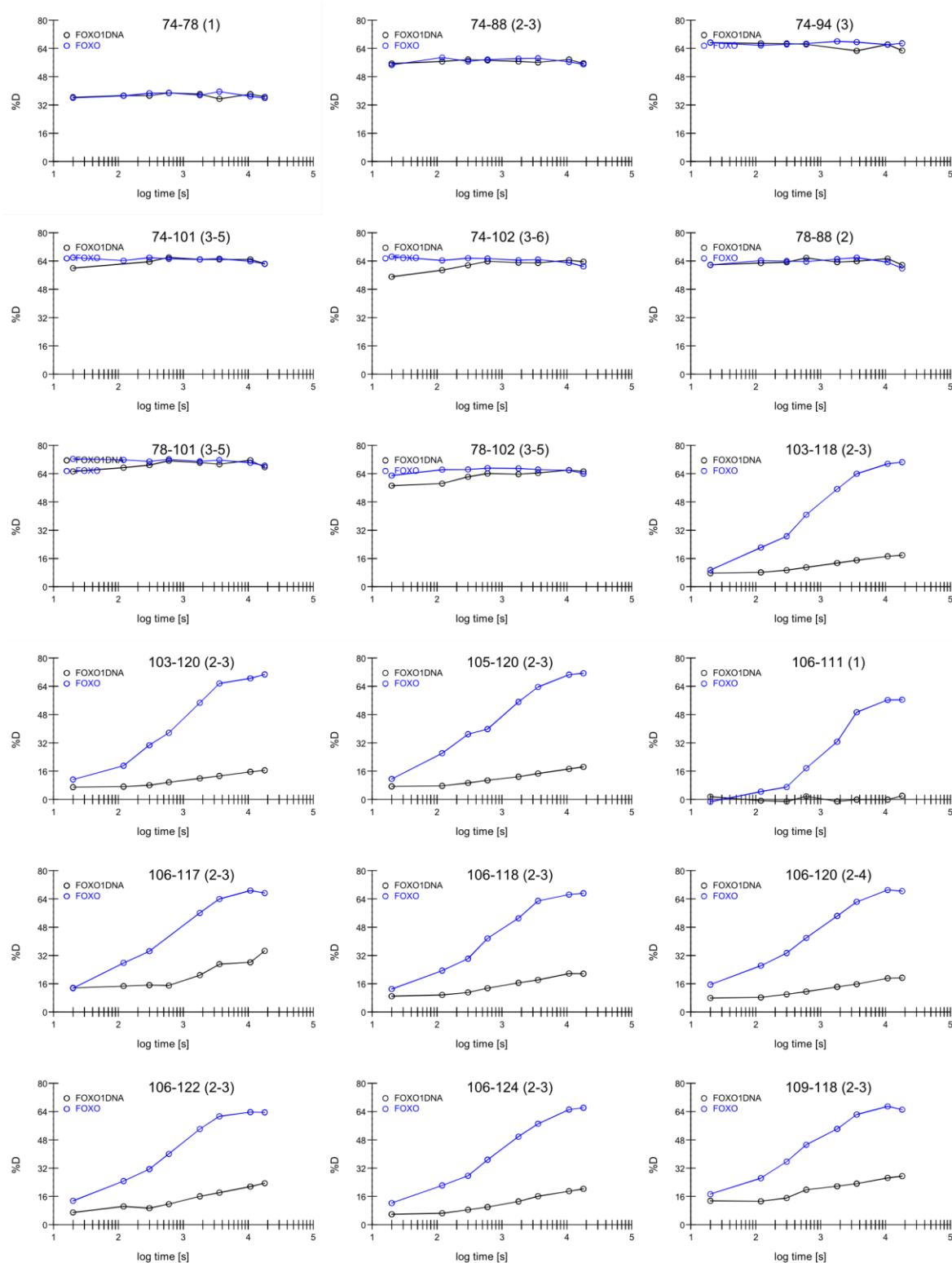
- (81) Stark, G. R.; Wang, Y.; Lu, T. *Cell Res.* **2011**, *21* (3), 375–380.
- (82) Maxwell, P. H.; Wiesener, M. S.; Chang, G. W.; Clifford, S. C.; Vaux, E. C.; Cockman, M. E.; Wykoff, C. C.; Pugh, C. W.; Maher, E. R.; Ratcliffe, P. J. *Nature* **1999**, *399* (6733), 271–275.
- (83) Desterro, J. M. .; Rodriguez, M. S.; Hay, R. T. *Mol. Cell* **1998**, *2* (2), 233–239.
- (84) Weigel, D.; Jürgens, G.; Küttner, F.; Seifert, E.; Jäckle, H. *Cell* **1989**, *57* (4), 645–658.
- (85) Kaestner, K. H.; Knochel, W.; Martinez, D. E. *Genes Dev.* **2000**, *14* (2), 142–146.
- (86) Furuyama, T.; Nakazawa, T.; Nakano, I.; Mori, N. *Biochem. J.* **2000**, *349* (Pt 2), 629–634.
- (87) Zhang, X.; Tang, N.; Hadden, T.; Rishi, A. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1813* (11), 1978–1986.
- (88) Borkhardt, A.; Repp, R.; Haas, O. A.; Leis, T.; Harbott, J.; Kreuder, J.; Hammermann, J.; Henn, T.; Lampert, F. *Oncogene* **1997**, *14* (2), 195–202.
- (89) Kops, G. J.; de Ruiter, N. D.; De Vries-Smits, A. M.; Powell, D. R.; Bos, J. L.; Burgering, B. M. *Nature* **1999**, *398* (6728), 630–634.
- (90) Essers, M. A. G.; Weijzen, S.; de Vries-Smits, A. M. M.; Saarloos, I.; de Ruiter, N. D.; Bos, J. L.; Burgering, B. M. T. *EMBO J.* **2004**, *23* (24), 4802–4812.
- (91) Takaishi, H.; Konishi, H.; Matsuzaki, H.; Ono, Y.; Shirai, Y.; Saito, N.; Kitamura, T.; Ogawa, W.; Kasuga, M.; Kikkawa, U.; Nishizuka, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96* (21), 11836–11841.
- (92) Matsuzaki, H.; Ichino, A.; Hayashi, T.; Yamamoto, T.; Kikkawa, U. *J. Biochem.* **2005**, *138* (4), 485–491.
- (93) Obsilova, V.; Vecer, J.; Herman, P.; Pabianova, A.; Sulc, M.; Teisinger, J.; Boura, E.; Obsil, T. *Biochemistry* **2005**, *44* (34), 11608–11617.
- (94) Obsil, T.; Ghirlando, R.; Anderson, D. E.; Hickman, A. B.; Dyda, F. *Biochemistry* **2003**, *42* (51), 15264–15272.
- (95) Kloet, D. E. A.; Burgering, B. M. T. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1813* (11), 1926–1937.
- (96) Tsuruta, F.; Sunayama, J.; Mori, Y.; Hattori, S.; Shimizu, S.; Tsujimoto, Y.; Yoshioka, K.; Masuyama, N.; Gotoh, Y. *EMBO J.* **2004**, *23* (8), 1889–1899.
- (97) Daitoku, H.; Sakamaki, J.; Fukamizu, A. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1813* (11), 1954–1960.

- (98) Van der Horst, A.; Tertoolen, L. G. J.; de Vries-Smits, L. M. M.; Frye, R. a; Medema, R. H.; Burgering, B. M. T. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279 (28), 28873–28879.
- (99) Nasrin, N.; Ogg, S.; Cahill, C. M.; Biggs, W.; Nui, S.; Dore, J.; Calvo, D.; Shi, Y.; Ruvkun, G.; Alexander-Bridges, M. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97 (19), 10412–10417.
- (100) Wang, F.; Marshall, C. B.; Yamamoto, K.; Li, G.-Y.; Gasmi-Seabrook, G. M. C.; Okada, H.; Mak, T. W.; Ikura, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, 109 (16), 6078–6083.
- (101) Brenkman, A. B.; de Keizer, P. L. J.; van den Broek, N. J. F.; Jochemsen, A. G.; Burgering, B. M. T. *PLoS One* **2008**, 3 (7), nedef.
- (102) Van der Horst, A.; de Vries-Smits, A. M. M.; Brenkman, A. B.; van Triest, M. H.; van den Broek, N.; Colland, F.; Maurice, M. M.; Burgering, B. M. T. *Nat. Cell Biol.* **2006**, 8 (10), 1064–1073.
- (103) Huang, H.; Tindall, D. J. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, 1813 (11), 1961–1964.
- (104) Hemmings, B. A.; Restuccia, D. F. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, 4 (9), nedef.
- (105) Kannan, K.; Jain, S. *Pathophysiology* **2000**, 7 (3), 153–163.
- (106) Eijkelenboom, A.; Burgering, B. M. T. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2013**, 14 (2), 83–97.
- (107) Coleman, M. L.; Marshall, C. J.; Olson, M. F. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, 5 (5), 355–366.
- (108) Dijkers, P. F.; Medema, R. H.; Pals, C.; Banerji, L.; Thomas, N. S.; Lam, E. W.; Burgering, B. M.; Raaijmakers, J. A.; Lammers, J. W.; Koenderman, L.; Coffey, P. J. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, 20 (24), 9138–9148.
- (109) Medema, R. H.; Kops, G. J.; Bos, J. L.; Burgering, B. M. *Nature* **2000**, 404 (6779), 782–787.
- (110) Schmidt, M.; Fernandez de Mattos, S.; van der Horst, a.; Klompmaker, R.; Kops, G. J. P. L.; Lam, E. W.-F.; Burgering, B. M. T.; Medema, R. H. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, 22 (22), 7842–7852.
- (111) Tang, T. T.-L.; Lasky, L. a. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278 (32), 30125–30135.
- (112) Weigelt, J.; Climent, I.; Dahlman-Wright, K.; Wikström, M. *J. Biomol. NMR* **2000**, 17 (2), 181–182.
- (113) Boura, E.; Rezaczkova, L.; Brynda, J.; Obsilova, V.; Obsil, T. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2010**, 66 (Pt 12), 1351–1357.

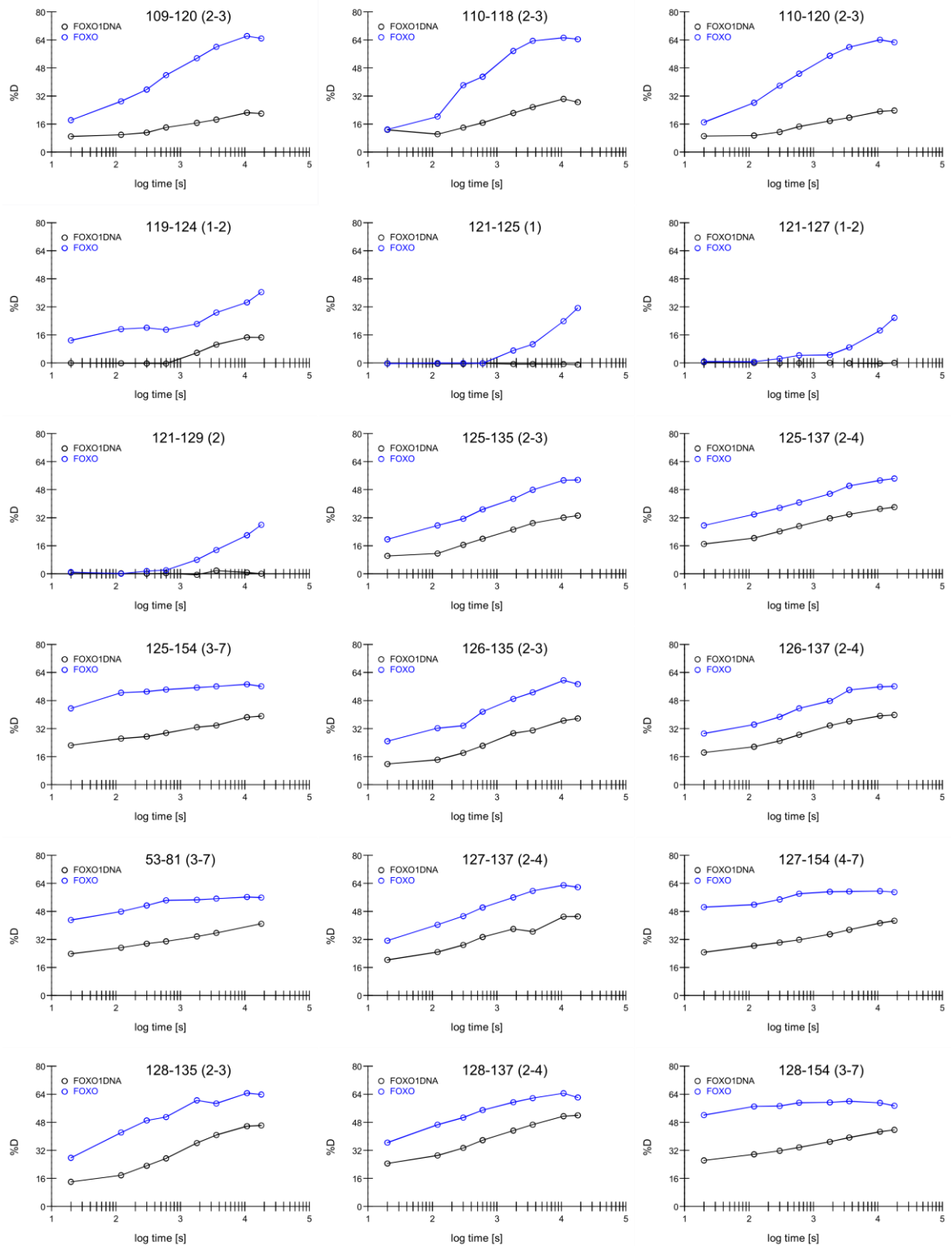
- (114) Boura, E.; Silhan, J.; Herman, P.; Vecer, J.; Sulc, M.; Teisinger, J.; Obsilova, V.; Obsil, T. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282 (11), 8265–8275.
- (115) Hizver, J.; Rozenberg, H.; Frolow, F.; Rabinovich, D.; Shakked, Z. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, 98 (15), 8490–8495.
- (116) Kendrew, J. C.; Bodo, G.; Dinitzis, H. M.; Parrish, R. G.; Wyckoff, H.; Phillips, D. C. *Nature* **1958**, 181 (4610), 662–666.
- (117) Kolenko, P.; Rozbeský, D.; Vaněk, O.; Bezouška, K.; Hašek, J.; Dohnálek, J. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2011**, 67 (Pt 12), 1519–1523.
- (118) Rozbesky, D.; Man, P.; Kavan, D.; Chmelik, J.; Cerny, J.; Bezouska, K.; Novak, P. *Anal. Chem.* **2012**, 84 (2), 867–870.
- (119) Wlodawer, A.; Minor, W.; Dauter, Z.; Jaskolski, M. *FEBS J.* **2008**, 275 (1), 1–21.
- (120) Williamson, M. P.; Havel, T. F.; Wüthrich, K. *J. Mol. Biol.* **1985**, 182 (2), 295–315.
- (121) Wüthrich, K. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265 (36), 22059–22062.
- (122) Vandermarliere, E.; Stes, E.; Gevaert, K.; Martens, L. *Mass Spectrom. Rev.* **2014**, 1–13.
- (123) Boldon, L.; Laliberte, F.; Liu, L. *Nano Rev.* **2015**, 6, 25661.
- (124) Vaněk, O.; Bezouška, K. *Chem. Listy* **2010**, 104, 1155–1162.
- (125) Fontana, A.; de Laureto, P. P.; Spolaore, B.; Frare, E.; Picotti, P.; Zambonin, M. *Acta Biochim. Pol.* **2004**, 51 (2), 299–321.
- (126) Percy, A. J.; Rey, M.; Burns, K. M.; Schriemer, D. C. *Anal. Chim. Acta* **2012**, 721, 7–21.
- (127) Konermann, L.; Pan, J.; Liu, Y.-H. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40 (3), 1224–1234.
- (128) Konijnenberg, A.; Butterer, A.; Sobott, F. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, 1834 (6), 1239–1256.
- (129) Singh, P.; Panchaud, A.; Goodlett, D. R. *Anal. Chem.* **2010**, 82 (7), 2636–2642.
- (130) Sinz, A. *Mass Spectrom. Rev.* **2006**, 25 (4), 663–682.
- (131) Vasilescu, J.; Guo, X.; Kast, J. *Proteomics* **2004**, 4 (12), 3845–3854.
- (132) Suchanek, M.; Radzikowska, A.; Thiele, C. *Nat. Methods* **2005**, 2 (4), 261–268.
- (133) Tang, X.; Munske, G. R.; Siems, W. F.; Bruce, J. E. *Anal. Chem.* **2005**, 77 (1), 311–318.

- (134) Tang, X.; Bruce, J. E. *Mol. Biosyst.* **2010**, *6* (6), 939–947.
- (135) Heck, A. J. R. *Nat. Methods* **2008**, *5* (11), 927–933.
- (136) Van den Heuvel, R. H. H.; Heck, A. J. R. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8* (5), 519–526.
- (137) Trcka, F.; Durech, M.; Man, P.; Hernychova, L.; Muller, P.; Vojtesek, B. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (14), 9887–9901.
- (138) Kavan, D.; Man, P. *Int. J. Mass Spectrom.* **2011**, *302* (1-3), 53–58.
- (139) Vaquerizas, J. M.; Kummerfeld, S. K.; Teichmann, S. a; Luscombe, N. M. *Nat. Rev. Genet.* **2009**, *10* (4), 252–263.
- (140) Agilent Technologies, I. BL21-Gold Competent Cells , BL21-Gold (DE3) Competent Cells , and BL21- Gold (DE3) pLysS Competent Cells Instruction Manual, 2010.
- (141) Tang, L.; Nogales, E.; Ciferri, C. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2010**, *102* (2-3), 122–128.
- (142) Houde, D.; Berkowitz, S. A.; Engen, J. R. **2011**, *100* (6), 2071–2086.

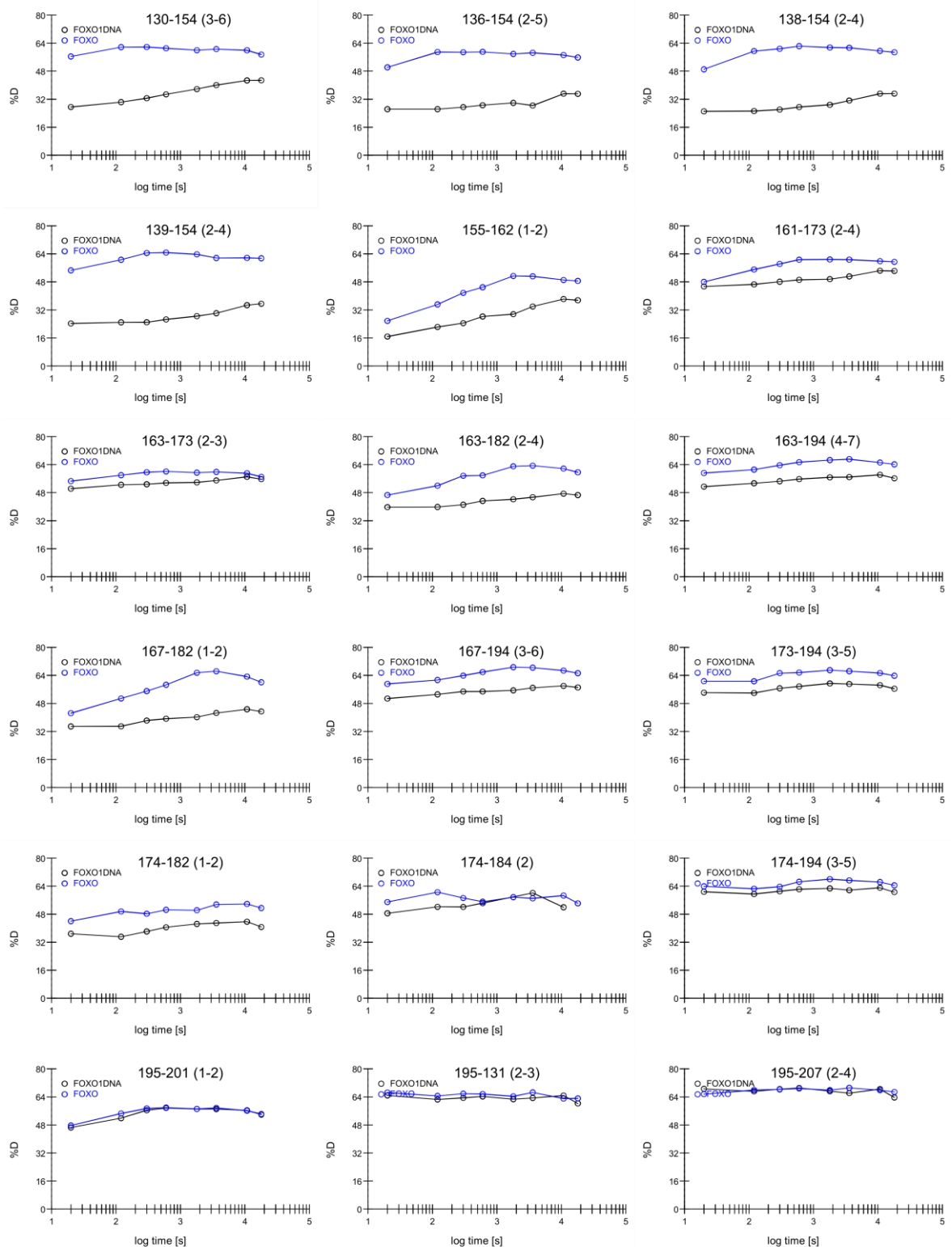
9 Příloha



Obr. 35: Kompletní sada výnosů relativní deuterační v závislosti na době značení pro jednotlivé identifikované peptidy (1/3). Každý peptid je označen pořadovým číslem počáteční a koncové aminokyseliny v sekvenci FOXO4. Dále jsou v závorce uvedeny pozorované nábojové stavy. Modrý výnos reprezentuje volnou FOXO4-DBD, černý pak doménu v komplexu s DNA. Vytvořeno programem DeutEx (Kavan, Man).



Obr. 36: Kompletní sada výnosů relativní deuterační v závislosti na době značení pro jednotlivé identifikované peptidy (2/3). Každý peptid je označen pořadovým číslem počáteční a koncové aminokyseliny v sekvenci FOXO4. Dále jsou v závorce uvedeny pozorované nábojové stavy. Modrý výnos reprezentuje volnou FOXO4-DBD, černý pak doménu v komplexu s DNA. Vytvořeno programem DeutEx (Kavan, Man).



Obr. 37: Kompletní sada výnosů relativní deuterační v závislosti na době značení pro jednotlivé identifikované peptidy (3/3). Každý peptid je označen pořadovým číslem počáteční a koncové aminokyseliny v sekvenci FOXO4. Dále jsou v závorce uvedeny pozorované nábojové stavy. Modrý výnos reprezentuje volnou FOXO4-DBD, černý pak doménu v komplexu s DNA. Vytvořeno programem DeutEx (Kavan, Man).

